

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Vztah mezi matrixovými metaloproteinázami a interleukiny-1 a -6 a vznikem
akutního koronárního syndromu

Lenka Ryšavá

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Ryšavá**
Osobní číslo: **C13380**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Vztah mezi matrixovými metaloproteinázami a interleukiny-1 a -6 a vznikem akutního koronárního syndromu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Z dostupné literatury uspořádejte základní informace o vlivu matrixových metaloproteináz a interleukinů-1 a -6 na vznik a rozvoj kardiovaskulárních onemocnění.
2. Podrobněji se zaměřte na aktuální informace o vztahu těchto metaloproteináz a interleukinů ke vzniku akutního koronárního syndromu.
3. Zpracujte přehledně také současné poznatky o stanovení těchto látek v lidském biologickém materiálu, včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Pavla Královcová, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

18. prosince 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2016



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 03. 07. 2017

Lenka Ryšavá

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Pavle Královcové, Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost, vstřícnost při konzultacích a ochotu, kterou mi v průběhu bakalářské práce věnovala.

ANOTACE

Cílem této práce je uspořádání základních informací o vlivu matrixových metaloproteináz a interleukinů-1 a -6 na vznik a rozvoj akutního koronárního syndromu. Rovněž je věnována stručnému popisu aterosklerózy a vzniku nestabilního aterosklerotického plátu. Bylo zjištěno, že celá řada matrixových metaloproteináz hraje roli v destabilizaci plátu, čímž se podílí na vzniku akutního koronárního syndromu. Interleukiny-1 a -6 jsou důležitými regulátory zánětlivých procesů, což znamená, že se tohoto procesu také jistým způsobem účastní, jelikož ateroskleróza patří mezi chronická zánětlivá onemocnění. Několik studií potvrdilo, že matrixové metaloproteinázy a interleukiny-1 a -6, zejména MMP-9 a interleukin-6, jsou budoucími slibnými markery pro akutní koronární syndrom a jiná kardiovaskulární onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

matrixové metaloproteinázy, akutní koronární syndrom, ateroskleróza, interleukin-1, interleukin-6, kardiovaskulární onemocnění

TITLE

The relationship between matrix metalloproteinases and interleukins-1 and -6 and the formation of acute coronary syndrome

ANNOTATION

The aim of this work is the arrangement of the basic information about the influence of matrix metalloproteinases and interleukins-1 and -6 the emergence and development of acute coronary syndrome. It also deals with a brief description of atherosclerosis and the formation of an unstable atherosclerotic plaque. A number of matrix metalloproteinases have been found to play a role in plaque destabilization, thereby contributing to the development of the acute coronary syndrome. Interleukins-1 and -6 are important regulators of inflammatory processes, that means these interleukins are in this process also involved in a certain way because atherosclerosis is a chronic inflammatory disease. Several studies have confirmed that matrix metalloproteinases and interleukins-1 and -6, especially MMP-9 and interleukin 6, are future promising markers for acute coronary syndrome and other cardiovascular diseases.

KEYWORDS

matrix metalloproteinases, acute coronary syndrome, atherosclerosis, interleukin-1, interleukin-6, cardiovascular diseases

OBSAH

ÚVOD.....	1
1 AKUTNÍ KORONÁRNÍ SYNDROM.....	2
1.1 Ateroskleróza.....	2
1.1.1 Fáze aterosklerózy.....	2
1.1.2 Nestabilní aterosklerotický plát.....	3
2 MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY.....	5
2.1 Metaloproteinázy.....	5
2.2 Matrixové metaloproteinázy.....	5
2.2.1 Struktura a aktivita matrixových metaloproteináz.....	7
2.3 Role matrixových metaloproteináz v ateroskleróze.....	8
2.3.1 Vliv na tvorbu aterosklerotických lézí.....	8
2.3.2 Vliv na destabilizaci plátu a jeho rupturu.....	9
2.4 Tkáňové inhibitory metaloproteináz a jejich role v ateroskleróze.....	11
3 PŘEHLED VÝZNAMNÝCH METALOPROTEINÁZ VE VZTAHU K ATEROSKLERÓZE A VZNIKU AKS.....	12
3.1 Kolagenázy.....	12
3.2 Želatinázy.....	13
3.2.1 Matrixová metaloproteináza-2.....	13
3.2.2 Matrixová metaloproteináza-9.....	14
3.2.3 Matrixová metaloproteináza-9 a TIMP-1.....	17
3.2.4 Tradiční čínská medicína a matrixová metaloproteináza-9.....	18
3.3 Stromelysiny.....	18
3.3.1 Matrixová metaloproteináza-3.....	18
3.3.2 Matrixová metaloproteináza-10.....	19
3.4 Ostatní metaloproteinázy.....	19
3.4.1 Specifický těhotenský plazmatický protein A.....	19
3.4.2 Matrixové metaloproteinázy -12, 13 a 14.....	20
4 METODY STANOVENÍ MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ.....	21
4.1 In situ zymografie.....	21
4.2 ELISA.....	21
4.3 FRET.....	22
4.4 Elektroforéza na čipu.....	22

4.5	Substrátová zymografie	24
4.6	Ostatní.....	25
5	STUDIE O METALOPROTEINÁZÁCH	27
5.1	Matrixové metaloproteinázy jako biomarkery u aterosklerotických kardiovaskulárních onemocnění	27
5.2	Inhibice metaloproteinázy pomocí antibiotika doxycyklinu	29
6	INTERLEUKIN-1 A INTERLEUKIN-6 A JEJICH ROLE V ATEROSKLERÓZE	31
6.1	Pojem cytokin a interleukin	31
6.2	Interleukin-1 a jeho role v ateroskleróze	31
6.2.1	Obecné informace o interleukinu-1	31
6.2.2	Interleukin-1 a ateroskleróza	32
6.2.3	Interleukin-33.....	35
6.3	Interleukin-6 a jeho role v ateroskleróze	36
6.3.1	Obecné informace o interleukinu-6.....	36
6.3.2	Interleukin-6 a ateroskleróza	36
6.4	Interleukin-6 a solubilní liganda CD40	39
7	STUDIE MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY A INTERLEUKINY-1 A -6.....	41
	ZÁVĚR.....	43
	POUŽITÁ LITERATURA	45

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Struktura MMP	7
Obrázek 2 - Distribuce MMP v aterosklerotických lézích	10
Obrázek 3 - Struktura MMP-9	14
Obrázek 4 - Hladina MMP-9 v séru u pacientů s AKS a stabilní CAD	15
Obrázek 5 – Přístroj Experion pro elektroforézu na čipu	23
Obrázek 6 - Virtuální gelový výstup z přístroje Experion pro MMP-9	24
Obrázek 7 - Reprezentativní zymogram pro MMP-2.....	25
Obrázek 8 - Želatinová zymografie pro MMP-9	25
Obrázek 9 – Inhibice metaloproteinázy pomocí antibiotika doxycyklinu – zymogram	30
Obrázek 10 - Role IL-1 v ateroskleróze	33
Obrázek 11 - Molekula IL-1 β	35
Obrázek 12 - Molekula IL-6	38
Tabulka 1 - MMP v ateroskleróze.....	6
Tabulka 2 - Metody stanovení MMP	26
Tabulka 3 - MMP jako biomarkery kardiovaskulárních onemocnění.....	27
Tabulka 4 - Hladiny Cut-Off MMP-1, MMP-9 a IL-6 pro CAD.....	42

SEZNAM ZKRATEK

- AKS – akutní koronární syndrom
- BMI – index tělesné hmotnosti
- CAD – onemocnění koronárních arterií
- CD40L – liganda CD40
- CK – kreatinkináza
- CK-MB – myokardiální izoenzym CK
- CRP – C-reaktivní protein
- ECM – extracelulární matrix
- ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
- FRET – fluorescenční rezonanční přenos energie
- HDL – lipoprotein o vysoké hustotě
- HDL-C – cholesterol v HDL částici
- IFN γ – interferon γ
- IL-1 – interleukin-1
- IL-1Ra – antagonist receptoru interleukinu-1
- IL-1 α – interleukin-1 α
- IL-1 β – interleukin-1 β
- IL-6 – interleukin-6
- LDL – lipoprotein o nízké hustotě
- LDL-C – cholesterol v LDL částici
- MI – infarkt myokardu
- MMP – matrixové metaloproteinázy
- mRNA – messengerová RNA
- NAP - nestabilní angina pectoris
- NSTEMI – akutní infarkt myokardu bez elevací ST
- PAD – onemocnění periferních tepen
- PAPP-A – specifický těhotenský plazmatický protein A
- SAP – stabilní angina pectoris
- sCD40L – solubilní liganda CD40
- SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným
- SMC – buňky hladkého svalstva
- STEMI – akutní infarkt myokardu s elevacemi ST

TIMP – tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz

TNF- α – tumor necrosis faktor α

VSMC – buňky hladkého svalstva v cévách

ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění je v současné době hlavní příčinou úmrtí. I přesto však moderní medicína udělala obrovský pokrok v léčbě pacientů, kteří byli hospitalizováni při podezření na akutní koronární syndrom či jinou srdeční příhodu. Nicméně velkou výzvou je dnes včasná diagnostika onemocnění. Ta má oproti léčbě jisté nedostatky, a to především z toho důvodu, že současně používané kardiomarkery jsou schopné detekovat pouze již nastalou nekrózu myokardu a ne tzv. časnou fázi ischemie. Jelikož hlavní příčinou akutního koronárního syndromu je ateroskleróza, je současným trendem medicíny také včasné najít a odhalit pacienta s nestabilním (vulnerabilním) plátem, který by později mohl způsobit akutní koronární syndrom. Z tohoto důvodu je dnes velká snaha nalézt nové markery, které by včasnou a rychlou diagnostiku rizikového pacienta umožňovaly. A právě matrixové metaloproteinázy a interleukiny se jeví v řadě studií jako vhodné a nadějně ukazatele časně ischemie myokardu a lokalizace nestabilního aterosklerotického plátu.

Cílem mé bakalářské práce je z dostupné literatury uspořádat základní informace o vlivu matrixových metaloproteináz a interleukinů-1 a -6 na vznik a rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Podrobně se zaměřit na aktuální informace o vztahu matrixových metaloproteináz a interleukinů ke vzniku akutního koronárního syndromu. Rovněž se zaměřit na současné známé metody stanovení těchto látek v lidském biologickém materiálu.

1 AKUTNÍ KORONÁRNÍ SYNDROM

Akutní koronární syndrom (AKS) je v dnešní době jednou z nejčastějších příčin úmrtí, co se týče kardiovaskulárních onemocnění. AKS je v podstatě definován jako skupina stavů, které jsou způsobené sníženým průtokem krve v koronárních tepnách. V důsledku toho není zasažená část srdce schopna správně pracovat nebo odumře (1). Tento termín AKS zahrnuje nestabilní anginu pectoris (NAP), akutní infarkt myokardu s elevacemi ST úseku na elektrokardiografické křivce (STEMI) a akutní infarkt myokardu bez elevací ST (NSTEMI). Někteří autoři do AKS řadí tzv. mikroinfarkt, který se odlišuje jen v laboratorních ukazatelích (2).

AKS je nejčastěji způsoben trombem uvnitř lumen koronární tepny, na straně, kde došlo k narušení nebo ruptuře aterosklerotického plátu. Rizikovými faktory pro výskyt AKS mohou být například věk a zánět. Naopak důležitou roli v prevenci vzniku AKS může mít zvýšená hladina HDL cholesterolu (HDL-C) (1).

1.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je hlavní příčinou vzniku AKS. Jedná se o dlouhodobý chronický zánětlivý proces, který přetrvává v důsledku působení různých prozánětlivých mediátorů, jako jsou například cytokiny (3). Skládá se z několika fází.

1.1.1 Fáze aterosklerózy

Během první fáze hraje významnou roli cholesterol v LDL částici (LDL-C). Za fyziologických podmínek jsou na povrchu buněk receptory, které vycytávají LDL-C. Vlivem většinou oxidativních změn dochází k modifikaci částic LDL (lipoprotein o nízké hustotě) a receptory buněk je již nerozeznají. LDL se pak hromadí ve stěně cévy a endotelové buňky produkcí glykoproteinů přitahují především monocyty a T-buňky. Za účasti dalších látek se monocyty mění na makrofágy. Monocyty, které jsou aktivovány, produkují řadu látek, jako například některé cytokiny, Tkáňový faktor (nejúčinnější aktivační protein koagulace) či matrixové metaloproteinázy (4). Pohlcováním oxidovaných LDL částic makrofágy vznikají pěnové buňky. Vlastnosti tukových buněk, které jsou vytvořené z diferencovaných makrofágů, záleží na zdroji lipidů. Hromaděním pěnových buněk se vytváří tukové proužky. Tukové proužky se mohou vyskytovat již u dětí, kde se mohou rozvíjet v další fáze aterosklerózy (5). Uvolnění LDL částic z pěnových buněk po jejich smrti způsobí další poškození endotelu.

Vznikají léze, pro něž je charakteristická, kromě výskytu pěnových buněk, ještě přítomnost buněk hladkého svalstva a extracelulárně uložených lipidů. Kumulací extracelulární matrix či depozit lipidů a dalších, vzniká útvar zvaný aterom (6). Prohlubující se endoteliální dysfunkcí vzniká aterosklerotický plát (7).

Aterosklerotický plát je tvořen lipidovým jádrem, bohatým na pěnové buňky a T-lymfocyty, které produkují tkáňové faktory a metaloproteinázy, a fibrózní čepičkou (krytem, obalem), která je velmi bohatá na makrofágy a další elementy (např.: buňky hladkého svalstva či vazivovou tkáň). Podle tloušťky fibrózní čepičky se rozlišují pláty na stabilní a nestabilní (vulnerabilní). Stabilní má čepičku silnou a neporušenou. Makrofágy produkcí řady látek, narušují fibrózní čepičku a spolu s dalšími faktory mohou způsobit rupturu plátu či erozi. V závěrečné fázi aterosklerózy dochází ke změnám v prasklém plátu. V nejkrajnějším případě vzniká buď kalcifikovaný plát nebo plát fibrotický, které mohou vést k angině pectoris nebo infarktu myokardu (MI). Méně závažnou variantou je, když se léze uzavřou němě, což může vést ke vzniku a rozvoji kolaterálního řečiště. Kolaterální řečiště zabezpečuje průtok krve tam, kde již není funkční přirozený průtok krve (6).

1.1.2 Nestabilní aterosklerotický plát

Ruptura vulnerabilního, neboli nestabilního, plátu způsobuje naprostou většinu AKS. Destabilizace plátu je závislá na vnitřních a vnějších faktorech. Nestabilní plát má tenkou fibrózní čepičku a ruptura takového plátu nastává v nejtenčím místě. Současně s narušováním fibrózní čepičky vlivem makrofágů syntetizujících proteolytické enzymy, které způsobují oslabení fibrózní čepičky, probíhá i zánětlivá reakce. Při vývoji aterosklerózy hraje zánětlivý proces velmi důležitou roli. Z tohoto důvodu bylo zjištěno, že teplota plátu byla při termografickém měření vyšší. Zvýšení teploty je způsobeno přítomností aktivovaných zánětlivých buněk, což se projeví i výskytem některých zánětlivých markerů (4, 7). Všechny tyto aspekty vedou k tomu, že vulnerabilní plát je náchylnější k erozi a ruptuře. Za vnitřní faktory lze považovat hypertenzi nebo vazokonstrikci, protože ke vzniku trhliny v aterosklerotickém plátu dochází především během fyzické námahy nebo emočního stresu (6).

Dojde-li k ruptuře plátu (prasknutím fibrózní čepičky), je uvolněn trombogenní materiál, který je obsažen v plátu, do cirkulující krve. Tímto je spuštěna vnější hemokoagulační kaskáda. Následně se v tomto místě začnou akumulovat trombocyty. Dochází k ukládání fibrinu a následnému vzniku trombu, který je umístěn na aterosklerotickém plátu. Následuje

rozšiřování do arteriální lumen, které může vést k NAP a ischemii (6). Mnozí autoři se shodují, že zánětlivá reakce hraje klíčovou roli v ruptuře plátu a trombóze. V tomto zánětlivém prostředí dochází k degradaci kolagenu ve fibrózní čepičce a jako následek smrti buněk hladkého svalstva k inhibici syntézy kolagenu (8) .

Tkáňový faktor je exprimován jak v místě ruptury plátu, tak i na povrchu aktivovaných monocytů (aktivace cytokiny), což vedlo k vysvětlení vzniku prokoagulačních dějů u pacientů s AKS i mimo prasklý plát. Proto jsou vulnerabilní pláty ve většině případů mnohočetné. To znamená, že u pacientů, kteří měli aterosklerotický plát považovaný za příčinu nestability, byl nalezen alespoň ještě jeden nestabilní plát, který byl lokalizován kdekoli v koronárních tepnách (4).

Poznání a pochopení patofyziologie koronární aterosklerózy vzrostlo během posledních 20 let. Současné studie se snaží identifikovat pacienta s vulnerabilním plátem v koronárním řečišti ještě dříve, než dojde k jeho ruptuře. Z tohoto důvodu je velká snaha nalézt markery, které by přítomnost nestabilního aterosklerotického plátu odhalily ještě dříve, než vznikne AKS (před projevem symptomů) (7).

2 MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY

2.1 Metaloproteinázy

Metaloproteinázy jsou enzymy, které ve své struktuře obsahují kov. Bez přítomnosti kovu nejsou aktivní (9). Nejpočetnější skupinou jsou enzymy, které ve své struktuře mají navázaný zinek – nazývají se zinek dependentní metaloproteinázy. Podle jejich struktury jsou rozčleněny do pěti základních skupin, a to na astakiny, termolysiny, prolysin metaloproteinázy, „serratia“ enzymy a matrixiny (10).

2.2 Matrixové metaloproteinázy

Matrixové metaloproteinázy (MMP), neboli matrixiny, jsou velmi početná skupina nejméně 24 strukturně příbuzných Zn^{2+} dependentních endopeptidáz (11). MMP jsou zásadní proteázy pro normální tkáňovou remodelaci a jsou důležitými regulátory řady fyziologických procesů, jako je například hojení ran, růst kostí či reprodukce nebo regulace funkce trombocytů (12). Jsou schopné štěpit několik komponent extracelulární matrix (ECM) ve stěně cév, jako elastin, kolagen, kasein a želatinu, a proteiny lokalizované na buněčném povrchu. Nicméně bylo zjištěno, že zvýšená indukce a zpracování MMP při jejich dysregulaci nebo aktivaci exprese MMP je biologicky významná i u řady patologických dějů, sem patří zánětlivá onemocnění, rakovina, Alzheimerova choroba, diabetes, kardiovaskulární onemocnění a další. MMP jsou zásadně zapojené v aterogenezi. Mají roli v destabilizaci aterosklerotického plátu, což je nejčastější mechanismus zodpovědný za vznik AKS. Schopnost měnit komponenty ECM ve stěně cév jim umožňuje potenciálně měnit složení aterosklerotického plátu a tím mohou způsobit destabilizaci plátu (13).

MMP jsou tvořeny především makrofágy, dále pak buňkami hladkého svalstva v cévách a endotelovými buňkami. MMP jsou lokalizované na okraji aterosklerotického plátu (14). Přehled známých MMP v ateroskleróze uvádí tabulka 1.

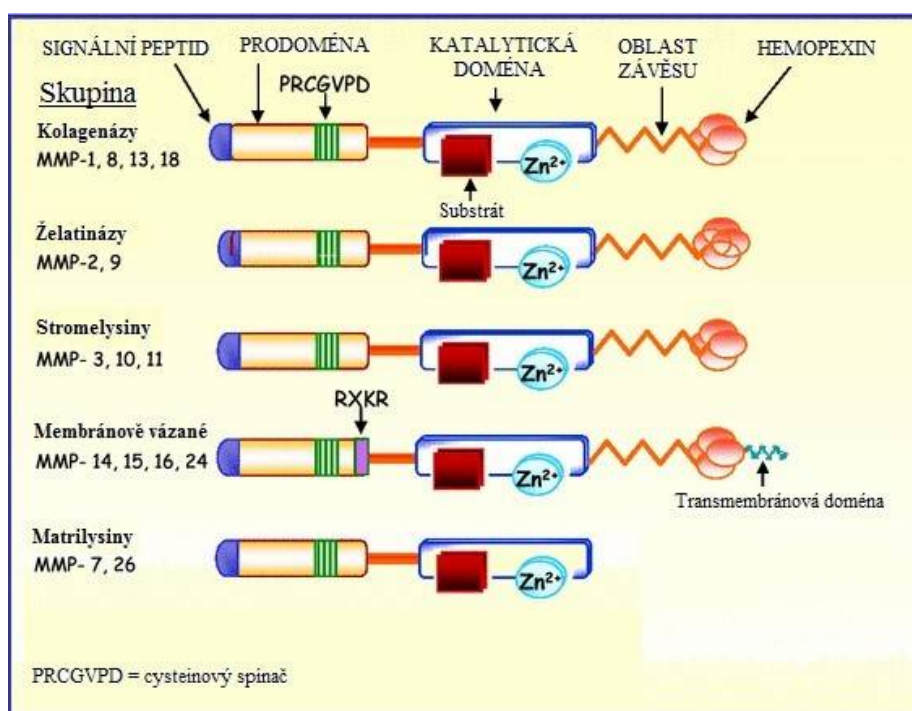
Tabulka 1 - MMP v ateroskleróze¹

Klasifikace matrixových metaloproteináz v ateroskleróze			
Skupina MMP	Označení MMP	Příklady substrátů	Zdroj v aterosklerotickém plátu
KOLAGENÁZY	MMP-1	Několik typů kolagenu (především typ III), želatina, proteoglykany	Makrofágy, endotelové buňky, SMC, trombocyty
	MMP-8	Několik typů kolagenu (především typ I), želatina, fibronectin	Makrofágy, endotelové buňky, SMC
	MMP-13	Několik typů kolagenu (především typ II), fibronectin, aggrecan	Makrofágy, SMC, endotelové buňky
ŽELATINÁZY	MMP-2	Želatina, několik typů kolagenu (především typ IV), pro-MMP-1, 2 a 13, cytokiny	Endotelové buňky, tukové proužky, SMC, VSMC, trombocyty
	MMP-9	Želatina, několik typů kolagenu (především typ IV), pro-MMP-2, 9 a 13, cytokiny	Makrofágy, SMC, VSMC, trombocyty
STROMELYSINY	MMP-3	Kolagen typu II, IV, IX, fibronectin, pro-MMP-1, 7, 8 a ostatní substráty ECM	Lymfocyty, makrofágy, SMC, trombocyty
	MMP-10	Kolagen typu II, IV, IX, želatina, pro-MMP-1, 7, 8 a ostatní substráty ECM	Endotelové buňky, makrofágy
	MMP-11	Fibronectin, aggrecan, slabá činnost proti ECM	Fibroblasty
MATRILYSINY	MMP-7	Kolagen typu IV, želatina, fibronectin, plasminogen, pro-MMP-1, 2 a 9	Makrofágy nádorové buňky
MEMBRÁNOVĚ VÁZANÉ MMP	MMP-14	Želatina, fibronectin, pro-MMP-2 a 13, proteoglykany, nativní kolagen typu I-III	SMC a makrofágy, trombocyty
OSTATNÍ MMP	MMP-12	Kolagen typu IV, fibrinogen, plasminogen, fibronectin, želatina a další substráty ECM	Makrofágy
	PAPP-A	Neznámé	VSMC a aktivované makrofágy

¹ KUKAČKA, J., R. KIZEK a R. PRŮŠA. cit. s.165; BÄCK, M. a kol. cit. s. 412-413; BUSTI, C. a kol. cit. s. 17.

2.2.1 Struktura a aktivita matrixových metaloproteináz

MMP dělíme podle mechanismu štěpení substrátu a substrátové specifity na matrilysiny, stromelysiny, kolagenázy, želatinázy, membránově vázané MMP a ostatní (9). Proteinová struktura MMP je složena z pěti domén: signální peptid, katalytická doména, hydrofobní propeptidová doména, oblast závěsu a hemopexinová doména. Signalizační a propeptidová sekvence tvoří NH₂-terminální doménu. Katalytická doména obsahuje vazebnou oblast pro zinek (Zn²⁺) a je také zodpovědná za proteolytickou aktivitu. U želatináz je katalytická doména odlišná od ostatních MMP, protože obsahuje tři domény fibronektinového typu II, které tvoří vazebnou oblast kolagenu, která umožňuje vazbu a následné štěpení kolagenu typu IV nebo denaturovaného kolagenu (želatiny) (15). Hemopexinová doména je spojena s katalytickou pomocí tzv. flexibilní oblasti závěsu, která tak umožňuje vazbu ostatních proteinů, ty pak mohou regulovat aktivitu MMP. Byla nalezena u všech MMP kromě MMP-7 a MMP-26 a zajišťuje substrátovou specifitu (15, 16) Struktura MMP je uvedena na obrázku 1.



Obrázek 1 - Struktura MMP²

MMP jsou syntetizovány jako latentní pro-formy neboli zymogeny. Jsou vylučovány do extracelulárního prostoru jako proenzymy. Zůstávají enzymaticky klidné do doby, než se

² BUSTI, C. a kol. cit. s.14.

začne štěpit vazba Zn^{2+} z katalytické domény a cysteinu z NH_2 -terminální propeptidové domény v procesu nazývaném cysteinové sepnutí (16, 17). Aktivita pro-MMP je přísně regulována a jejich činnost je inhibována rodinou antagonistů specifických tkáňových inhibitorů, které se nazývají tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMP). Jejich transkripce je naopak regulována pozitivně nebo negativně pomocí cytokinů a růstových faktorů, jakou jsou zejména interleukin-1 (IL-1) a interleukin-6 (IL-6), nebo tumor necrosis faktor alfa (TNF α) (18).

2.3 Role matrixových metaloproteináz v ateroskleróze

Exprese MMP byla experimentálně prokázána v lidských aterosklerotických plátech. Většina MMP je z plátu vylučována, kromě asi šesti membránově vázaných MMP, které jsou vloženy nebo připojeny k vnějšímu povrchu membrány. Důkazy, že MMP hrají roli v patologickém procesu aterosklerózy, pochází částečně nejvíce od myších modelů, v menší míře pak od modelů králíčích (5).

2.3.1 Vliv na tvorbu aterosklerotických lézí

Lokalizace MMP vedla ke zjištění, jak se MMP účastní děje destabilizace aterosklerotického plátu. Normální tepny vytváří pouze pro-MMP-2, TIMP-1 a TIMP-2 a nevykazují žádnou aktivitu MMP (19). Naopak zvýšená aktivita několika MMP (MMP-1, MMP-3 a MMP-13) byla zjištěna uvnitř aterosklerotického plátu v porovnání s normální tepnou (20). Morfologická analýza odhalila, že hlavním příčinou zvýšené exprese MMP v rámci aterosklerotických lézí jsou makrofágy. Při transformaci monocytů na makrofágy také dojde k nadměrné produkci MMP-9 a MMP-14, což může podnítit jejich invazi skrze intimu. Následně přijímají oxidované LDL částice, čímž se z nich stanou pěnové buňky. A právě pěnové buňky jsou velmi bohatým zdrojem MMP. Přitom periferní monocyty tvoří MMP ve vysokých dávkách. Makrofágy v aterosklerotických lézích se nacházejí na hranicích lipidového jádra. Například kolagenázy (MMP-13 a MMP-1, jak je vidět na obrázku 2) jsou lokalizovány spolu s markery pro štěpený kolagen blízko fibrózní čepičky (19, 21).

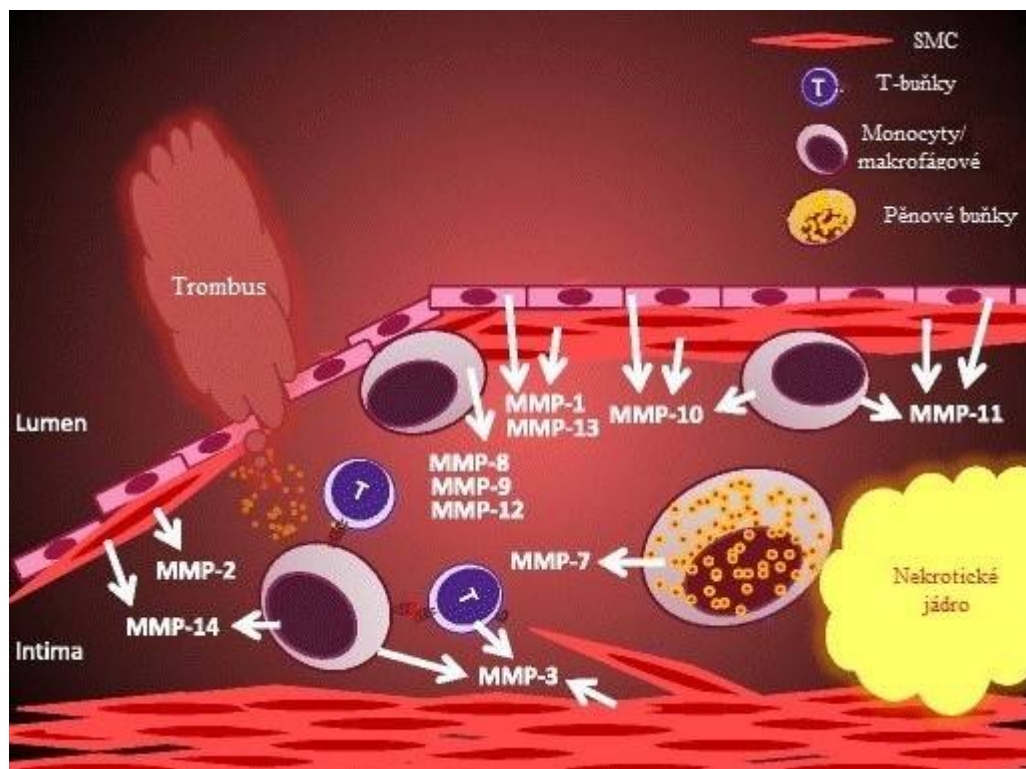
Nadmíra MMP způsobí větší degradaci ECM. Remodelace a narušování ECM vlivem MMP odstraní bariéru a umožní tak diapedézu zánětlivých buněk a příliv plazmových proteinů skrz cévní stěnu. Jedním z možných mechanismů toho, jak se MMP podílí na tvorbě plátu, může být usnadnění a (nebo) povzbuzení k migraci buněk hladkého svalstva (SMC) přes vnitřní elastickou lamínu do intimy. Nejdůležitějšími MMP, které tuto migraci podporují, jsou MMP-9

a MMP-2. MMP podnítí proliferaci SMC také generováním monomerního kolagenu. Touto cestou se tak podílí na růstu ateromu. Proces doprovází zvyšující se syntéza a hromadění ECM, což vede k tvoření pokročilého aterosklerotického plátu (13, 15).

2.3.2 Vliv na destabilizaci plátu a jeho rupturu

Narušení aterosklerotického plátu, nacházejícího se v koronárních arteriích, je poslední dobou hlavní příčinou náhlé srdeční smrti (22). Jelikož MMP proteolyticky degradují kolagen, stává se tím fibrózní čepička, která kryje lipidové jádro, slabší. Z toho důvodu je pak náchylnější k ruptuře. Jakmile dojde k ruptuře plátu, je umožněn kontakt krve a pro-koagulačního lipidového jádra. Následné zánětlivé reakce vedou k aktivaci krevních destiček. Jakmile dojde k obnažení endotelu, vznikne trombus (14).

Vysoce zánětlivé aterosklerotické pláty vykazovaly obecně zvýšenou aktivitu MMP. Konkrétně byly nalezeny zvýšené hodnoty MMP-1, MMP-3 a MMP-9. V oblastech, které jsou náchylné k prasknutí, byly nalezeny zvýšené hladiny například MMP-8, MMP-11, MMP-14 a MMP-16. MMP-9 a MMP-12 fragmentují elastin, kdežto MMP-3 a MMP-7 rozkládají štěpené kolageny a proteoglykanové bílkoviny jádra. A jako doplněk toho, že MMP mohou pracovat společně, mohou teoreticky zcela degradovat arteriální ECM. Degradace ECM pomocí MMP tedy redukuje tloušťku fibrózní čepičky a kolagenového obsahu, což je typické pro vulnerabilního plátu, náchylný k ruptuře. Další vlastností nestabilního plátu je hojnost pěnových buněk, jak už bylo zmíněno, význačný zdroj hned několika MMP (21). Pěnové buňky jsou schopné taky spustit apoptózu SMC, které obklopují, čímž opět dochází k narušení plátu (6). Distribuci MMP v aterosklerotických lézích včetně příkladů jejich hlavní zdrojů uvádí obrázek 2.



Obrázek 2 - Distribuce MMP v aterosklerotických lézích³

Na destabilizaci plátu se podílí například MMP-1. Její vysoké hodnoty transkripce byly nalezeny u karotických lézí, které měly velké lipidové jádro a tenkou fibrózní čepičku v porovnání s lézemi, které měly fibrózní čepičku silnou (13). Na druhou stranu, například MMP-3 je zapojena do stabilizace aterosklerotického plátu a to tím, že může naopak zvýšit tloušťku fibrózní čepičky a zabránit tak ruptuře plátu. To, která činnost MMP bude převládat, závisí na spektru exprese MMP, dále pak na úrovni aktivity MMP a na fázi vývoje plátu (13, 21).

MMP-12 je také zapojena do destabilizace plátu. V porovnání s pláty, které měly silnou fibrózní čepičku, byly nalezeny vyšší hodnoty MMP-12 u plátů, které měly čepičku tenčí. Kromě toho, králíci geneticky modifikováni tak, aby tvořili lidskou MMP-12, měli narušenou elastickou laminu v tunica media s příležitostnými lézemi podobným aneurysmatu. Aneurysma neboli rozšíření tepny či výdut' je způsobeno změnami ve stěně cévy. (13).

Nynější experimentální objevy znamenají, že MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-12 a MMP-14 se ukazují jako potenciální cíle pro identifikaci nestabilních aterosklerotických plátů detekovatelných pomocí zobrazovacích technik, jakými jsou pozitronová emisní

³ KETELHUTH, D. F. J.; BÄCK, M., cit. s. 163.

tomografie (PET) nebo magnetická rezonance (MRI) nebo pro vývoj terapie stabilizující plát (13).

Zánětlivé cytokiny (Např.: IL-1), růstové faktory a CD40L (složka membrán aktivovaných T-lymfocytů) vyvolávají sekreci MMP-1, MMP-3 a MMP-9. Zjištění vedlo k domněnce, že se objevila cesta k regulaci nadměrné tvorby MMP. Jelikož cílení specifických cytokinů nebo zásah do signalizační cesty by mohlo snížit aktivitu MMP v aterosklerotickém plátu. Jako jeden příklad lze uvést studii, kdy se pomocí inhibice CD40L podařilo stabilizovat plát u myšího modelu, což mohlo být i částečně způsobeno díky účinkům na MMP (21).

2.4 Tkáňové inhibitory metaloproteináz a jejich role v ateroskleróze

Nadměrná aktivita MMP způsobuje přílišnou degradaci ECM, namísto řízené a vyrovnané remodelace. Jejich nadměrná aktivita je proto určitým způsobem regulována. Mají dva rozdílné typy inhibitorů. Prvním je alfa-2-makroglobulin. Druhým typem inhibitorů jsou specifické tkáňové inhibitory metaloproteináz, neboli TIMP. TIMP jsou nízkomolekulární proteiny, které mohou komplexně splynout s vysokou účinností s aktivní MMP v molárním poměru 1:1. Na TIMP vhodná aminokyselinová sekvence blokuje MMP tak, že se zapojí do aktivního katalytického místa na MMP. Tím, že se TIMP naváže na katalytickou doménu MMP, zabrání přístupu substrátu. Známe čtyři tkáňové inhibitory MMP, jsou jimi TIMP-1, TIMP 2, TIMP-3 a TIMP-4. Nejvíce prostudované jsou TIMP-1 a TIMP-2 (16, 23, 24).

Odlišný od ostatních TIMP je TIMP-3. Jeho unikátnost spočívá v tom, že se přímo váže na proteiny extracelulární matrix a tím může poskytnout prostředky pro stabilizaci komplexu MMP-TIMP uvnitř intersticiálního prostoru. Zároveň bylo prokázáno, že inhibuje TNF- α konvertující enzym (16).

Zejména je pak zajímavý TIMP-1, který je schopen se vázat na několik MMP s vysokou afinitou. Ukázalo se, že TIMP-1 snižuje relativní míru apoptózy, kdežto ostatní TIMP mohou buněčnou smrt urychlit. Zvláště pak vzájemný vztah TIMP-1 a MMP-9 je předmětem početné skupiny studií ve vztahu k AKS či ateroskleróze (24, 25). Tento vztah bude podrobně probrán v kapitole 3.2.3. TIMP-1 by mohl být důležitým ukazatelem prognózy u srdečního selhání (7). Jeho hladiny jsou podstatně vyšší u skupiny pacientů s NSTEMI než u pacientů s NAP nebo kontrolní skupinou (25).

3 PŘEHLED VÝZNAMNÝCH METALOPROTEINÁZ VE VZTAHU K ATEROSKLERÓZE A VZNIKU AKS

3.1 Kolagenázy

Kolagenázy jsou skupina MMP, které mají schopnost štěpit vláknitý kolagen několika typů (typ I, II a III). Štěpí ho na charakteristické části, které mohou být poté degradovány ostatními MMP (16, 17).

Kolagenáza MMP-1 přednostně štěpí kolagen typu III. Exprese MMP-1 je lokalizována na okraji aterosklerotických lézí a na fibrózní čepičce. Hlavními buněčnými zdroji jsou SMC, makrofágy a endoteliální buňky. MMP-1 obsahují i destičky a je z nich uvolněna po vystavení krevních destiček trombinu (26). Regulátory a inhibitory MMP-1 jsou například oxidované LDL částice, TNF α , IL-1 (IL-1 β) a IL-6. Při detailní analýze plátu se zjistilo, že MMP-1 má vyšší úroveň transkripce v lézích karotid (karotida neboli krkavice či krční tepna), které mají velké lipidové jádro a tenkou čepičku. U pacientů s nedávnými ischemickými projevy byly nalezeny zvýšené hladiny MMP-1, což je jedním z důvodů nestability plátu. Celkově vzato, výsledky studie podporují roli MMP-1, odvozené od zánětlivých buněk, v ruptuře plátu. Měření vzorků, které byly odebrané z koronární sinusové krve, odhalila, že hladiny MMP-1 se zvyšují u pacientů s MI nebo u pacientů s NAP v porovnání s kontrolní skupinou a s pacienty se stabilním koronárním onemocněním. Avšak následná analýza vzorků periferní krve nedokázala detekovat a odlišit pacienty s onemocněním koronárních arterií (CAD) a kontrolní zdravou skupinou. Nicméně se zdá, že hladiny MMP-1 se zvyšují s pokročilými koronárními lézemi, což bylo prokázáno u pacientů s komplexními lézemi (13, 17).

Studie z roku 2015 (E. Cavusoglu a kol.) objevila, že zvýšené hladiny MMP-1 byly silným a nezávislým ukazatelem úmrtnosti (z celé řady příčin) široké populace mužských pacientů, kteří podstoupili koronární angiografii, včetně těch s AKS. Zůstává však otázkou, zda MMP-1 představuje marker nebo zprostředkovatel rizika. Pokud by se podařilo najít odpověď na tuto otázku, mohla by mít potenciální terapeutické důsledky, jelikož existuje celá řada inhibitorů MMP. Toto vše je v současné době ve výzkumu (26).

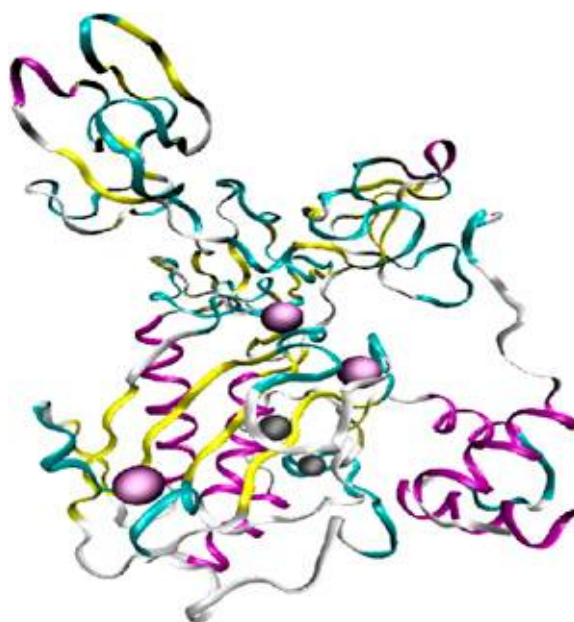
3.2 Želatinázy

Mezi želatinázy řadíme MMP-2 (želatináza A) a MMP-9 (želatináza B). Jsou to hlavní enzymy, které jsou zodpovědné za degradaci kolagenu a denaturovaného kolagenu (želatiny) a celou řadu dalších komponent ECM. Oba typy želatináz jsou schopné štěpit pro formy MMP do jejich aktivní formy. Bylo prokázáno, že plně uzavřené léze, tukové proužky, fibroaterom s krvácením a kalcifikací jsou bohatým zdroji MMP-2 a MMP-9. Tyto dva druhy želatináz by mohly pomoci k hodnocení lézí. Jednoduše by mohly identifikovat ty nejvíce rizikové (17).

3.2.1 Matrixová metaloproteináza-2

V normálních cévách je MMP-2 tvořena nepřetržitě endoteliálními buňkami a SMC. Zvýšená exprese této MMP byla zjištěna v tukových proužcích a aterosklerotickém plátu v porovnání s normálními oblastmi cévy. Aktivita MMP-2 je regulována nejvíce TIMP-2 a poté i TIMP-1. MMP-2 by mohla být potenciální marker u NAP, akutního MI (17). Jedna studie například ukázala poprvé spojení mezi plazmatickou hladinou MMP-2 a umístěním cerebrální aterosklerózy (více převládá u Asiatů) (27). Aktuální studie také dokázaly propojení mezi cirkulujícími hladinami MMP-2 (společně s MMP-9 a MMP-8) a onemocněním periferních tepen (PAD), jelikož byly nalezeny vyšší hodnoty MMP-2 u pacientů s PAD (28). Hodnoty MMP-2 jsou rovněž zvýšené u pacientů s AKS. Například hladiny cirkulujících MMP-2 byly nezávisle spojené s vývojem akutního MI, více než u stabilní anginy pectoris (SAP) (14). Hladina MMP-2 v plazmě či séru se velmi zvyšuje právě po akutní kardiovaskulární příhodě (17). Aktivní MMP-2 může rozvíjet agregaci trombocytů v reakci na slabé aktivační podněty, což může podnítit a zvýšit riziko vzniku trombotické příhody (13). Všechna tato zjištění vedla k tomu, že MMP-2 by v budoucnu mohla být potencionálním biomarkerem pro CAD. Avšak než se tak stane, je zapotřebí dalších studií (17).

3.2.2 Matrixová metaloproteináza-9

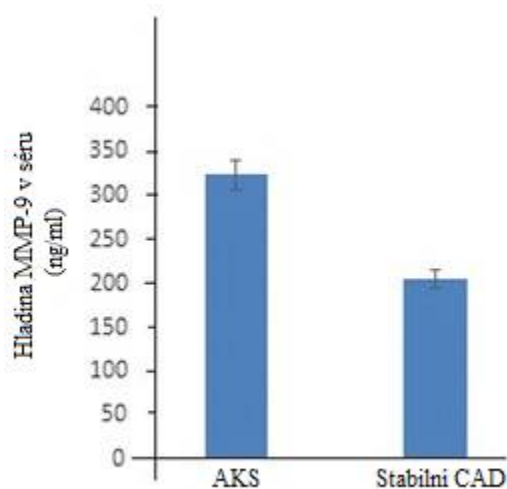


Obrázek 3 - Struktura MMP-9⁴

MMP-9 je zapojena do degradace a změny struktury u kolagenní matrix a je uvolňována do koronárního řečiště hlavně vinou plátu v koronární arterii u pacientů s akutním MI (29). Má dvě formy. Neaktivní zymogenní (pro-MMP-9) a aktivní formu. Aktivní forma MMP-9 způsobuje ztenčování fibrózní čepičky. Struktura MMP-9 je uvedena na obrázku 3. Atomy Zn^{2+} jsou šedivě a atomy Ca^{2+} jsou fialově. Sekrece a exprese MMP-9 pochází především od makrofágů. Nicméně role MMP-9 u předpovědi vzniku AKS zůstává prozatím neznámá, je však cílem řady studií (1).

Studie F. Darabi a kol. ukázala, že průměrná hodnota MMP-9 v séru u sledované skupiny pacientů s AKS byla v porovnání se stabilní CAD velmi vysoká., což ukazuje obrázek 4 (1). Na základě těchto výsledků by se MMP-9 mohla stát potenciálním biomarkerem pro AKS, což by mohlo umožnit časnou diagnostiku AKS ještě před rozvojem nekrózy myokardu v tzv. stádiu ischemie. Existují však nadále jistá omezení, která prozatím znemožňují převedení experimentální studie do klinické praxe. Je to například malým souborem vyšetřovaných pacientů, nebo nemožnost stanovit průměrnou hodnotu MMP-9 v plazmě z heparinované krve, i když při použití jiných antikoagulačních prostředků to již problém není. Dále je to nemožnost stanovit aktivní formu MMP-9 metodou ELISA. Zjištění této studie tedy je, že u pacientů s AKS je zvýšená exprese MMP-9 (1, 30).

⁴ ZÍTKA, O. a kol. cit. s. 858.



Obrázek 4 - Hladina MMP-9 v séru u pacientů s AKS a stabilní CAD⁵

Popis obrázku: Hladina MMP-9 v séru je významně vyšší u pacientů s AKS než u pacientů se stabilní CAD 9 (1).

Vzestup MMP-9 během AKS byl popsán již několikrát. Nejvíce patrný vzestup MMP-9 byl u pacientů s AKS, kteří byli vyšetřeni krátce na to, kdy se objevily první příznaky. Zhruba do 4 hodin od vzniku symptomů, což se považuje za velký přínos stanovení MMP-9, jelikož klasické myokardiální markery selhávají (jejich vzestup se neprojeví tak rychle). Senzitivita stanovení do 4 hodin od vzniku potíží je poměrně vysoká (cca 85,2%), stejně jako specifita (cca 75%). Za optimální hladinu cut-off MMP-9 se považuje 46 ng/ml. Na rozdíl od troponinu T, by hodnota MMP-9 neměla být ovlivněna vzestupem kreatininu (30).

Dále jedna studie zjistila, že maximální koncentrace MMP-9 v plazmě souvisí s větším poškozením funkce levé komory a může tak předpovídat stupeň remodelace levé komory (udáváno v týdnech po propuštění z nemocnice) (12). Vyšší hodnoty MMP-9 jsou tedy spojeny se zhoršenou funkcí levé komory u nemocných po MI a pokud zvýšení přetrvávalo, byl v následujících dnech zaznamenán jistý menší stupeň remodelace (7).

Dále jedna studie z roku 2015 (G.H. Hamed a M. F. A. Fattah) zkoumala spojení mezi hladinou MMP-9 a tepovou frekvencí. Byla zjištěna významná pozitivní korelace mezi MMP-9 a tepovou frekvencí. Vzrůstající tepová frekvence měla klíčový a vzájemný vztah se zjištěnou hladinou MMP-9 v plazmě. Nicméně ještě nebylo objasněno, zda tento vztah mezi

⁵ DARABI, F. a kol. cit s. 56.

plazmatickou hladinou MMP-9 a tepovou frekvencí je způsoben zvýšenou srdeční frekvencí nebo naopak srdečním sehnáním (12).

Několik studií prokázalo, že koncentrace MMP-9 u pacientů s CAD je přímo spojena se zánětlivými markery, jako jsou například C-reaktivní protein (CRP), IL-6 či fibrinogen. Je třeba dodat, že koncentrace MMP-9 může být ovlivněna celou řadou faktorů, jako je věk, pohlaví, diabetes, dislipidémie, kouření a vysoký tlak (31). A právě diabetes je také spojen s nestabilitou aterosklerotického plátu a způsobuje vysoké riziko pro vznik akutní koronární příhody. Výsledky studie ukázaly, že celková hladina MMP-9 byla vyšší u diabetiků s AKS ve srovnání s kontrolní skupinou a pacienty s AKS, kteří nebyli diabetici (32).

Ukázalo se, že pacienti s AKS, kteří měli vysoké hladiny MMP-9 při diagnóze, měli zvýšené riziko koronární revaskularizace, což je přemostění zúžené části věnčité tepny pomocí žilního nebo tepenného štěpu, čímž se obnoví zásobení okysličené krve u postižené části srdce se snahou předejít vzniku MI. Analýza hladin MMP-9 po 18 měsících od prodělaného akutního MI prokázala, že MMP-9 byla nezávislým ukazatelem koronární revaskularizace, což naznačuje stěžejní roli MMP-9 v aterotrombóze u pacientů s akutním MI. Zvýšená plazmatická koncentrace u pacientů s akutním MI se na základní hladinu dostala během jednoho týdne. MMP-9 by mohla být zvažena jako včasný marker rizika identifikace pacientů s AKS, jelikož umí spolehlivě rozlišit pacienty s akutním MI od těch s NAP. Vysoké hladiny MMP-9 jsou v blízkém spojení se závažností onemocnění a s rozsahem komplikací AKS (12, 25, 32, 33).

Studie z roku 2013 (Guzel S. a kol.) objevila, že v porovnání s kontrolní skupinou a NAP byly po přijetí pacientů hladiny MMP-9 v séru významně vyšší u NSTEMI. Nemocní s NSTEMI měli také vyšší počet leukocytů v porovnání s NAP. Bylo rovněž zjištěno, že MMP-9 ovlivňuje stabilitu plátu ve spojení s různými zánětlivými cytokiny (25). Dalším zjištěním jiné studie je fakt, že vstupní hodnoty MMP-9 u pacientů s AKS byly téměř dvakrát tak vyšší, než u těch pacientů se SAP (34).

Obecně lze tedy říci, že vysoká koncentrace MMP-9 je spojená s nepříznivým vývojem kardiovaskulárního onemocnění. Hraje ale také významnou roli u cévní mozkové příhody (mrtvice). A to z toho důvodu, že je exprimována v leukocytech po právě prodělané mrtvici (35).

3.2.3 Matrixová metaloproteináza-9 a TIMP-1

Rovnováha mezi MMP a TIMP je v procesu remodelace velmi důležitá. Vztah MMP/TIMP je významný u pacientů, kteří prodělali MI a udává tím diagnostickou a předpovědní informaci (7). TIMP-1 je hlavním inhibítozem MMP-9 (25). Lze spekulovat, že u nemocných s AKS je rovnováha mezi produkcí a inhibicí MMP posunuta směrem ke zvýšené proteolytické aktivitě (34). Poměr například mezi MMP-9 a TIMP-1 a vztahem s AKS je cílem celé řady studií (36). Bylo prokázáno, že koncentrace MMP-9 a TIMP-1 jsou spojeny s vývojem a remodelací levé komory u osob po MI (7).

Jedna studie z roku 2013 (Guzel S. a kol.) objevila, že hladiny MMP-9 jsou po přijetí pacientů s NSTEMI významně vyšší než ty pozorované po 24 a 48 hodinách. Hladina MMP-9 je tedy podstatně vyšší po 12 hodinách než ta po 48 hodinách. Zatímco hladina TIMP-1 v séru je významně nižší než hladina po 48 hodinách. Hodnoty TIMP-1 po přijetí postupně stoupaly a nejvyšších hodnot dosáhly po 72 hodinách. Rovněž byla pozorována podstatná pozitivní korelace mezi MMP-9 a TIMP-1. Toto zjištění ukázalo, že TIMP-1, v reakci na aktivaci MMP-9, hraje ochrannou roli během časné fáze NSTEMI. Tyto výsledky naznačují, že stanovení MMP-9 a TIMP-1 v séru by mohlo představovat senzitivní marker zánětu u pacientů s NSTEMI. Omezením této studie byl nízký počet pozorovaných jedinců a neúčast skupiny pacientů se STEMI (25).

Naopak v jiné studii již byla skupina se STEMI pacienty zahrnuta. V této studii (Jing Tan a kol.) byla nalezena podstatně zvýšená koncentrace poměru MMP-9 a TIMP-1 byla u pacientů se STEMI oproti kontrolní skupině, což ukazuje, že MMP-9 má významný a pozitivní vztah s TIMP-1. Tento pozoruhodný nárůst poměru MMP-9/TIMP-1 u pacientů se STEMI ukazuje na nerovnováhu mezi MMP-9 a TIMP-1 v mikroprostředí nestabilního aterosklerotického plátu. Může tak být, alespoň částečně, zodpovědný za prasknutí plátu, které může vést eventuálně ke vzniku kardiovaskulárních příhod (36).

Poměr MMP-9 a TIMP-1 by se mohl stát nezávislým ukazatelem komplexních lézí (24). Poměr MMP-9/TIMP-1 byl podstatně vyšší u pacientů s AKS než u kontrolní skupiny. Byla nalezena negativní korelace mezi adiponektinem a poměrem MMP-9/TIMP-1, což může poskytnout přehled o porozumění patologickým změnám koronárních plátů. Adiponektin je protein specifický pro adipocyty, který je hojně přítomen v lidské plazmě. Byla zjištěna jeho důležitá role ve vývoji aterosklerózy. Tato negativní korelace naznačuje, že adiponektin

ovlivňuje poměr MMP-9/TIMP-1 tím, že způsobí změnu rovnováhy mezi MMP-9/TIMP-1, což má vliv na stabilitu plátu. Dále analýza ukázala, že poměr MMP-9/TIMP-1 je ukazatelem AKS. Z toho důvodu zvyšující se poměr MMP-9/TIMP-1 byl tedy ukazatelem stability koronárních plátů, které charakterizují AKS a odráží tak závažnost koronární aterosklerózy (29).

3.2.4 Tradiční čínská medicína a matrixová metaloproteináza-9

Tradiční čínská medicína má asi 3000 let starou historii. Má celou řadu jedinečných teorií v etiologii, léčbě a diagnóze. Zájem o tradiční čínskou patentovanou medicínu v posledních letech narůstá také v zemích západní civilizace. A právě jedna studie z roku 2013 (J. Wang a kol.) se zabývala účinky Xuefu Zhuyu (XFZY) a Shengmai (SM) na vývoj syndromů a markerů zánětu u pacientů s NAP. Především se sledovala hodnota MMP-9 a dalších markerů (CRP atd.). Měření probíhalo po dobu 12 týdnů (37).

Kapsle XFZY jsou tradiční čínskou patentovanou medicínou nejčastěji používány na odstranění krevní stáze (zpomalení přirozeného pohybu tekutiny). Skládá se z 11 čínských bylinek. Kapsle SM je také čínskou medicínou hojně používána, a to nejčastěji na tonifikaci (tj. dosažení svalového napětí). SM se skládá ze 3 bylinek (37).

V porovnání s předchozí léčbou se hladina MMP-9 během prvního týdne významně zvýšila u kontrolní skupiny a také u skupiny XFZY a SM. Nicméně se později během 12 týdnů podstatně snížila u skupiny XFZY a SM v porovnání s kontrolní skupinou. Z tohoto důvodu by léčba pomocí XFZY a SM mohla být velmi přínosná, jelikož se hladina MMP-9 po delším používání XFZY a SM výrazně snížila a toto snížení by mohlo předcházet zánětlivé odpovědi (37).

3.3 Stromelysiny

Stromelysiny jsou schopné degradovat velmi mnoho komponent stromálních tkání a bazálních membrán. Jsou podobné kolagenázám, avšak vlastnost, která je od nich odlišuje, je neschopnost degradovat kolagen typu I (17).

3.3.1 Matrixová metaloproteináza-3

Zdrojem MMP-3 v aterosklerotickém plátu jsou makrofágy, lymfocyty a SMC. Transkripce MMP-3 je indukována IL-1 β a růstovým faktorem odvozeným od trombocytů. Mnohonásobně zvýšené hladiny MMP-3 byly nalezeny v lézích karotid (17). MMP-3 se účastní

aktivační kaskády u ostatních pro-MMP, které se pak v konečném důsledku všech pochodů stanou aktivními. Například MMP-3 aktivuje pro MMP-1 na aktivní MMP-1 (16).

Co se týká koronárních arterií, výsledky nejsou zatím zcela jednoznačné. Hodnota MMP-3 v séru byla nižší u pacientů s MI v porovnání s kontrolní skupinou. Nicméně při dalším podrobnějším zkoumání bylo pozorováno, že hladina MMP-3 se zvyšuje mezi nultou a 96 hodinou od přijetí z důvodu MI, ačkoli při pozdějším vyšetření byly hladiny MMP-3 opět nižší. Avšak vyšší hladiny MMP-3 byly také pozorovány při odběru krve například z koronárního sinu u pacientů s AKS v porovnání s kontrolní skupinou a stabilním koronárním onemocněním. Z toho důvodu můžeme uvažovat MMP-3 jako průsečík několika cest, které jsou základem těchto klinických událostí. V důsledku toho by MMP-3 mohla být kandidátem pro další výzkum, protože vysoké cirkulující hladiny u pacientů s MI byly popsány jako ukazatele budoucích kardiovaskulárních příhod (13, 17, 38).

3.3.2 Matrixová metaloproteináza-10

MMP-10 je dalším ze zástupců stromelysinů. Zdrojem MMP-10 v aterosklerotickém plátu jsou endotelové buňky a makrofágy. Zvyšující se hladiny MMP-10 jsou spojené s pláty a s tloušťnutím intima-media krční tepny (17). Jedna studie z roku 2015 uvedla, že hladiny cirkulující MMP-10 se zvyšují u pacientů s PAD, podle závažnosti onemocnění a ve spojení se špatnou prognózou. Z tohoto důvodu byla proto MMP-10 navržena jako marker závažnosti onemocnění aterosklerotického procesu (28).

3.4 Ostatní metaloproteinázy

3.4.1 Specifický těhotenský plazmatický protein A

Specifický těhotenský plazmatický protein A (PAPP-A) je zinek vázající metaloproteináza. PAPP-A byla původně identifikována v plazmě u těhotných žen (používá se pro screening Downova syndromu). Indukuje aktivaci růstového faktoru odvozeného od inzulínu, který zase indukuje zánět a absorpci lipidů, což přispívá k aterogenezi a nestabilitě plátu. V posledních letech ale byla její zvýšená hladina v cirkulující krvi nalezena i u pacientů s AKS či jiným koronárním onemocněním. Zvýšená hladina byla také nalezena v prasklých a erodovaných plátech. PAPP-A je tvořena nejspíše buňkami cévní stěny a aktivovanými makrofágy a je uvolňována při prasknutí aterosklerotického plátu. Její přítomnost byla detekována u nestabilních aterosklerotických plátů, a naopak nebyla detekována u stabilních

plátů. Omezené počty studií ukázaly, že PAPP-A dovede identifikovat nemocné, u nichž je riziko vzniku AKS vysoké, i když mají negativní troponin. Což by v závěru znamenalo, že by PAPP-A měla schopnost rozeznat pacienta s vulnerabilním plátem ještě dříve, než u něho dojde k aterotrombotické příhodě. (4, 7, 8, 20).

3.4.2 Matrixové metaloproteinázy -12, 13 a 14

MMP-12 je nejvíce produkována makrofágy a degraduje velké množství komponent kolagenu. Zajímavým zjištěním je, že MMP-12 má tendenci degradovat aktivované MMP-2 a MMP-3. Zvýšená hladina MMP-12 byla rovněž nalezena u plátů s tenkou fibrózní čepičkou. Pouze jediná studie prozkoumala, že by MMP-12 mohla být potenciálním biomarkerem u pacientů s CAD, jelikož u nich našly zvýšené hladiny MMP-12. Nicméně jsou nezbytné další studie (13, 17).

MMP-13 řadíme mezi kolagenázy. Štěpí kolagen typu II. Nalézáme ji v aterosklerotickém plátu na obdobných místech jako MMP-1 a jejich zdroje exprese jsou také stejné, tedy endotelové buňky, makrofágy a SMC (13, 17).

MMP-14 patří mezi tzv. membránově vázané MMP a aktivuje pro-MMP-2. V aterosklerotických lézích je lokalizovaná s MMP-2 v SMC a makrofázích a spolu s ostatními MMP, je cílem studií k identifikaci nestabilního plátu nebo pro vývoj terapie stabilizující plát. Všechny tyto MMP jsou v určité spojitosti zapojeny do tvorby aterosklerotických lézí a následnou jejich nestabilitou, avšak doposud žádná studie nepotvrdila, že by mohly tyto MMP být markery kardiovaskulárních onemocnění, například u pacientů s AKS (13, 17).

4 METODY STANOVENÍ MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ

Současné metody stanovení MMP slouží především k detekci a stanovení jejich aktivity (18). Avšak jedním z problémů, kterým v současné době čelí klinické výzkumy při detekci MMP, je nedostatek analytických validovaných metod. Dnes běžně používanými metodami jsou enzymatické, fluorimetrické in vivo zobrazovací metody a také metody především imunochemické. Imunochemické metody předstihují enzymatické, ale nedokáží odlišit neaktivní formu MMP od formy aktivní. Fluorimetrické metody používají k detekci fluorescenčně značené substráty, které vykazují nízké detekční limity. Další z metod, které jsou předmětem zájmu, je metoda zymografie (39).

4.1 In situ zymografie

Tato metoda používá enzymatický podkladový substrát nebo krycí vrstvu k detekci a lokalizaci specifických proteázových aktivit v různých tkáňových úsecích. Jednoduše řečeno, specifický enzymatický substrát pro konkrétní proteázu je uložen na nebo pod zmrazenou částí nefixované tkáně, které je umístěná na skleněných sklíčkách. Během inkubace dochází k štěpení substrátu v závislosti na čase a dávce příslušnými aktivními enzymy v jejich přirozeném místě. Po uplynutí inkubační doby může být lýza značeného substrátu detekována buď světelnou mikroskopií nebo fluorescenční mikroskopií, čímž umožní lokalizaci aktivity specifické proteázy ve tkáňových úsecích. To, jakým způsobem bude detekována, závisí na typu substrátu. U fluorescenční mikroskopie lze po inkubaci pozorovat aktivitu MMP jako černé jamky na fluorescenčním pozadí v důsledku proteolýzy. Jednou z výhod in situ zymografie je, že je celkem nízkonákladovou metodou. Naopak hlavní nevýhodou je, že citlivost detekce (snížením v intenzitě barvení) je poměrně nízká. Nevýhodou je také nemožnost tuto metodu použít pro kvantitativní účely (18, 40).

4.2 ELISA

ELISA (z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay) je známou biochemickou metodou, která slouží ke kvantitativnímu stanovení přítomnosti protilátky nebo antigenu ve vzorku. ELISA je založena na specifické reakci antigenu a protilátky. Protilátka nebo antigen je navázána (zakotvena) na nosič, nejčastěji mikrotitrační destičku. Na jednom z účastníků této reakce je navázaný enzym, který katalyzuje přeměnu substrátu po jeho přidání do reakční směsi.

Produkt reakce je barevný, proto se stanovuje buď spektrofotometricky nebo fluorimetricky. Koncentrace produktu je přímo úměrná koncentraci protilátky nebo antigenu ve vzorku. Sady (kity) ELISA především pro lidské MMP jsou velmi široce dostupné. Touto metodou se stanovuje například nejčastěji MMP-9 (vzorek séra se ředí 1:100) a spodní hranice detekce byla 3 ng/ml. Nevýhodou je, že neumí změřit aktivitu enzymu, ale měří množství proteinu (1, 18). ELISA se využívá ke stanovení opravdu celé řady látek. Naprostá většina studií kromě velkého množství MMP touto metodou stanovují například i IL-1 a IL-6.

4.3 FRET

Metoda FRET (z angl. fluorescence resonance energy transfer) neboli fluorescenční rezonanční přenos energie, je založena na měření interakce protein-protein. K posouzení enzymatické aktivity se používají krátké syntetické peptidy. Peptidová sekvence napodobuje místo štěpení, které je přítomno v přirozeném substrátu MMP. Nejvhodnější způsob detekce aktivity enzymu je založen na aplikaci fluoroforu. FRET se vztahuje k neradiačnímu přenosu energie v excitovaném stavu mezi kolokalizovanými donorovými a akceptorovými fluorofory. Vzhledem k tomu, že se jedná o fluorofory v těsné blízkosti (~ 5 nm), zaznamená FRET molekulární interakci mezi fluorescenčně značenými bílkovinami. Jakmile je peptid štěpen MMP, skupiny jsou odděleny, což se projeví významným zvýšením fluorescenčního signálu. Tato metoda je poněkud jednoduchá a vhodná ke sledování aktivity MMP. Má však jednu velkou nevýhodu. Nevýhoda této techniky spočívá v tom, že pouze napodobuje interakci mezi enzymem a jeho přirozeným substrátem. FRET se používá také ve farmacii ke sledování ztráty účinnosti léčivého přípravku (18, 41).

4.4 Elektroforéza na čipu

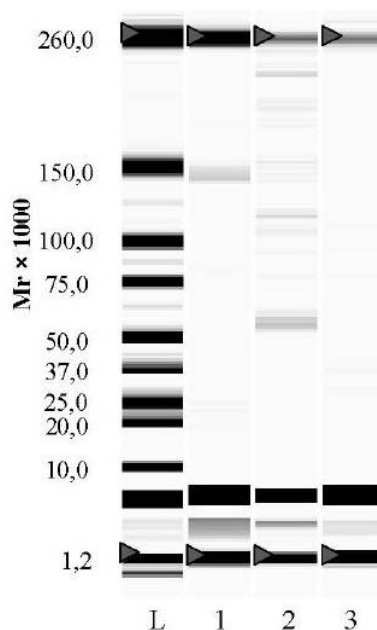
Kapilární elektroforéza na čipu je metoda, která poskytuje zároveň probíhající analýzu několika desítek vzorků, a to během několika minut. Vzorek, který je potřeba na analýzu, má objem několika pikolitrů, což je rozhodně velkou výhodou. Do mikročipu jsou vyleptány kanálky, ve kterých probíhá separace vzorku. Jakmile jsou na čipu nanášeny všechny nařazené vzorky, jsou vpraveny elektrokineticky do injektorové oblasti. Poté probíhá elektroforetická separace vzorků a následná detekce, která je zprostředkována nejčastěji pomocí laserem indukované fluorescence (9). Sestava pro elektroforézu na čipu je uvedena na obrázku 5.



Obrázek 5 – Příklad přístroje Experion pro elektroforézu na čipu⁶

Tato metoda se nejčastěji využívá k výzkumu interakce MMP-9 s kolagenem (nejčastěji hovězím). Cílem studie z roku 2011 (O. Zítka a kol.) bylo právě využití čipové elektroforézy pro vyšetření této interakce. Měření byla provedena na přístroji Experion od firmy Bio-Rad. Jedná se o automatický systém využívající k analýze proteinů, DNA i RNA. Vzorek se připraví podle návodu od výrobce. Analyzované vzorky se naředily. Naředěné vzorky se smíchaly s redukčním pufrem v určitém poměru a nechaly krátce inkubovat při 100 °C. Následně se k směsi přidala voda. Čip se naplnil gelem a následně se naředěná směs nanasla do jednotlivých kanálků v čipu. Separace je založena na klasické kapilární elektroforéze. Jsou zde také elektrody, které jsou kapilárou připojeny ke spodní straně čipu. Analýza vzorku je velmi rychlá, zhruba 1 min, záleží na molekulové hmotnosti a cílových molekulách, které jsou detekovány fluorescenčním detektorem (39). Pomocí softwaru k přístroji Experion, lze výsledky zobrazit v podobě elektroforeogramu, který je zobrazen na obrázku 6. Výsledek potvrdil to, že MMP-9 štěpí kolagen, ale také zároveň, že je možno tuto interakci detekovat automatickou elektroforézou na čipu (9).

⁶Experion, McMaster University Centre for Microbial Chemical Biology cit. [online].



Obrázek 6 - Virtuální gelový výstup z přístroje Experion pro MMP-9⁷

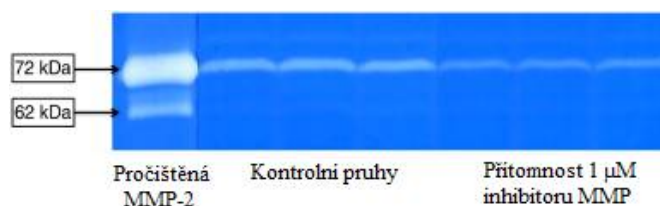
Popis obrázku: V dráze č. 1 je vyobrazena detekce 100 ng MMP-9. U analýzy kolagenu nebyl zachycen žádný signál (velká molekulová hmotnost kolagenu, dráha č. 3). Při interakci obou proteinů vznikly fragmenty o různých molekulových hmotnostech (dráha č. 2). Dráha značená písmenem L je standard (9).

4.5 Substrátová zymografie

Nejrozšířenější technikou, která se používá k detekci aktivity MMP je substrátová zymografie. Tato metoda je elektroforetickou technikou, která je založena na SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným), která zahrnuje kopolymerový (kopolymerace = řetězová polymerace dvou či více různých monomerů) substrát s polyakrylamidovým gelem, který slouží k detekci aktivity enzymu na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Lze rozlišit aktivní a latentní formy MMP, protože mají rozdílné molekulové hmotnosti. Různé MMP mohou být detekovány touto metodou v závislosti na substrátu. Kaseinová zymografie se používá k detekci MMP-1, MMP-12 a MMP-13. K detekci MMP-1 a MMP-13 se využívá i kolagenová zymografie, kde detekční limit pro MMP-1 je 0,1 pg a pro latentní formu MMP-1 10 pg. Nejvíce používanou zymografií, je zymografie želatinová. Slouží k detekci MMP-2 a MMP-9 (18). Příklad zymogramu pro MMP-2 je uveden na obrázku 7.

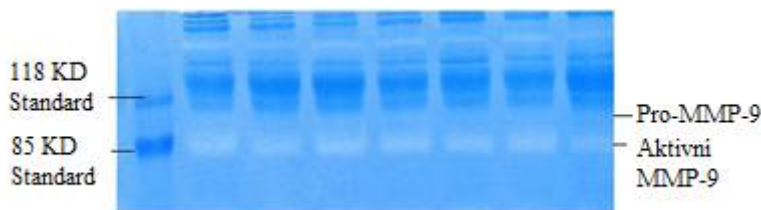
⁷ ZÍTKA, O. a kol. cit. s. 200.

Želatinová zymografie pracuje s gely (SDS-PAGE), které jsou kopolymerovány s želatinou. Kritickým krokem této metody je příprava vzorku a jeho extrakce z tkáně nebo buněk. Obecný postup metody je následující: Vzorky se naředí a nechají inkubovat potřebnou dobu při dané teplotě. Naředěné vzorky se po inkubaci nanasou do jamek v gelu. Po proběhlé elektroforéze se gel promyje pufrům a nechá při pokojové teplotě za pomalého míchání. Poté se inkubují ve vývojovém pufru a následně se barví pomocí barviva nazvaného Coomassie Brilliant Blue. Po uplynutí této doby se gely fotografují pomocí zobrazovacího systému. Plocha odděleného pásma byla měřena v pixelech (1, 18). Želatinová zymografie pro MMP-9 je uvedena na obrázku 8.



Obrázek 7 - Reprezentativní zymogram pro MMP-2⁸

Popis obrázku: Zymogram srdeční tkáně. Inkubační roztok obsahoval neselektivní inhibitor MMP v konečné koncentraci 1 μ M (18).



Obrázek 8 - Želatinová zymografie pro MMP-9⁹

Popis obrázku: Vzorek séra a proteinový standard byly podrobeny elektroforéze v 10 % SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným) s želatinou (1).

4.6 Ostatní

Jednou z méně využívaných metod ke stanovení MMP-9 je i analýza messengerové RNA (mRNA) MMP-9. Žilní krev se odebere do zkumavky s EDTA přímou žilní punkcí a je centrifugována. Poté se vzniklý „buffy coat“, což je část antikoagulované krve obsahující

⁸ KUPAI, K. a kol. cit. s. 208.

⁹ DARABI, F. a kol. cit. s. 56.

leukocyty a trombocyty, smíchá s potřebnými reagensy. V případě dalšího zpracování se uloží při -80 °C. Extrahuje se celková RNA a vyčistí se s použitím speciálního kitu. Následně se měří koncentrace MMP-9 mRNA pomocí real-time kvantitativní reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (35).

Přehled metod stanovení MMP, včetně jejich výhod a nevýhod uvádí tabulka 2.

Tabulka 2 - Metody stanovení MMP¹⁰

Metoda	Výhody	Nevýhody
<i>In situ zymografie</i>	Nízké náklady, lokalizace MMP v tkáních	Nízká citlivost detekce, nemožnost použití pro kvantitativní účely
<i>ELISA</i>	Vyžaduje nízké množství vzorku	Nestanoví aktivitu enzymu
<i>FRET</i>	Jednoduchost, vhodná ke sledování aktivity MMP	Možnost ovlivnění screeningu detergentem, metoda interakci mezi enzymem a jeho přirozeným substrátem pouze napodobuje
<i>Elektroforéza na čipu</i>	Rychlá analýza vzorku, výstupy v elektronické podobě (virtuální gely)	Dosud málo popsané interakce mezi různými typy MMP (je předmětem studií)
<i>Substrátová zymografie</i>	Odděluje latentní a aktivní MMP	Dlouhý protokol

¹⁰ KUPAI, K. a kol. cit. s. 206; ZÍTKA, O. a kol. cit. s. 858-860.

5 STUDIE O METALOPROTEINÁZÁCH

5.1 Matrixové metaloproteinázy jako biomarkery u aterosklerotických kardiovaskulárních onemocnění

V současnosti je diagnostika poškození srdce, ať už z jakýchkoliv příčin odkázaná na markery, které detekují pouze nekrózu myokardu. Jsou jimi především laktátdehydrogenáza (LD), aspartátaminotransferáza (AST) a kreatinkináza (CK), konkrétně je to myokardiální izoenzym (CK-MB). MMP degradují komponenty ECM a mohou být tak zapojené do vývoje aterosklerózy a destabilizaci aterosklerotických plátů (13). Z tohoto důvodu se studují MMP jako vhodné budoucí markery, a to především pacientů s AKS (30). Hlavní výzvou v medicíně, dá se říct, je přesná a perfektní diagnóza, prognóza a léčba pacientů s AKS. Dalším účelem studií je poskytnout přehled o roli MMP v rozvoji, progresi a komplikacích aterosklerózy u kardiovaskulárních onemocnění (15). Omezený počet studií, provedených na lidech, ukázal zvýšené hladiny MMP u pokročilé CAD a AKS. Zvýšené hladiny u pacientů s CAD byly spojené s budoucím rizikem kardiovaskulárních příhod. Nicméně je zapotřebí mnohem více dat k tomu, abychom mohli určit skutečnou přírůstkovou hodnotu cirkulujících hladin MMP. Zajímavé, na rozdíl od očekávání, je zjištění, že zvýšené hodnoty tkáňových inhibitorů MMP (TIMP) jsou také ve spojení se vzrůstajícím rizikem kardiovaskulárních příhod u pacientů s CAD (8). Tabulka 3 uvádí přehled MMP jako biomarkerů kardiovaskulárních onemocnění.

Tabulka 3 - MMP jako biomarkery kardiovaskulárních onemocnění¹¹

Skupina	Označení MMP	Výsledek	Kardiovaskulární onemocnění
Kolagenázy	MMP-1	↑	CAD, AKS
	MMP-8	↑	CAD, stenóza karotidy
Želatinázy	MMP-2	↑	CAD, AKS
	MMP-9	↑	CAD, AKS, stenóza karotidy, PAD
Stromelysiny	MMP-3	↓	Symptomatická CAD, MI
		↑	Prvních 96 h AKS
	MMP-10	↑	Tlustá vrstva intima-media
Matrilysiny	MMP-7	↑	CAD
Ostatní MMP	MMP-12	↑	CAD

¹¹KETELHUTH, D. F. J.; BÄCK, M., cit. s.166.

Nejblíže ke klinické praxi má v současné chvíli MMP-9 (30). Z tohoto důvodu jsem vybrala jednu studii z roku 2015, která se detailně zabývala odhalením počáteční hladiny MMP-9 ve vztahu k pacientům jako charakteristický a diagnostický marker k rozlišení AKS od SAP. Zabývala se také zhodnocením jejich hodnot jako ukazatele budoucího rizika vzniku kardiovaskulárních komplikací a výsledku nemoci (12).

Studie (Hamed a Fattah, 2015) byla provedena na 120 pacientech, z toho 20 pacientů bylo jako zdravá kontrolní skupina. Probíhala cca 6 měsíců. Byla odebrána venózní krev v naprosto sterilním prostředí do hladké zkumavky bez antikoagulantu. Pacientům bylo provedeno klasické biochemické vyšetření (vyšetření glukózy v krvi, LDL-C, CK-MB, LDH, troponin T). Vzorky pro měření MMP-9 byly odebrány okamžitě po hospitalizaci u pacientů s diagnózou AKS, zpravidla do 4 hodin od počáteční bolesti na hrudi. Stanovení hladiny MMP-9 v séru bylo provedeno metodou ELISA (s použitím kitu od firmy RayBiotech). Minimální detekovatelná dávka MMP-9 byla 10 pg/ml. Pacienti s AKS měli významně vyšší index tělesné hmotnosti (BMI), průměrnou srdeční frekvenci a LDL-C v porovnání s kontrolní skupinou. Výsledky této studie odhalily, že MMP-9 byla významně zvýšená u všech pacientů s AKS v porovnání s kontrolní skupinou nebo s pacienty se SAP. Nejvyšší hodnoty pak byly nalezeny u pacientů se STEMI, pak u NSTEMI a následně u NAP. Objevila pozitivní vztah mezi MMP-9 a tepovou frekvencí. Zajímavé zjištění bylo, že nemocní s AKS se špatnými výsledky, měli zvýšené hladiny MMP-9 dříve než ti s dobrou prognózou. Závěr této studie je tedy, že odhalila pacienty s AKS, kteří měli zvýšené hladiny MMP-9 v séru. Podobné výsledky byly objeveny i v jiných studiích (např.: studie Tahindi A. a kol z roku 2011 (42)). Výše zmíněné výsledky mohou ukazovat na to, že hladina MMP-9 se postupně zvyšuje se zvyšující se závažností klinického projevu (12).

Dyslipidémie patří také mezi rizikové faktory aterosklerózy. Pacienti s tímto onemocněním byli v jedné studii podrobena farmakoterapií. Byl u nich zjištěn významný pokles cholesterolu oproti jedincům, kteří byli jen v dietním režimu. Tento významný pokles při farmakoterapii pravděpodobně spočíval v odstranění hromadících se makrofágů v aterosklerotických plátech, což mělo za následek inhibici aktivity MMP. U pacientů s tímto onemocněním byla naměřena zvýšená koncentrace cirkulující MMP-9 (20).

MMP-2 a MMP-9 mohou způsobit nestabilitu plátu skrze degradaci ECM, apoptózu SMC a podpořením infiltrace zánětlivých buněk (27). MMP-3 je považována za vhodný budoucí marker nestability aterosklerotických plátů, nicméně prozatím jsou u této MMP

výsledky sporné a nejednoznačné (13, 17). Rovněž PAPP-A by mohl být vhodným markerem aterosklerózy, jelikož existuje několik důkazů, že dokáže odhalit rupturu plátu dříve než markery, které se dnes používají například pro diagnostiku MI a srdeční nekrózy (20).

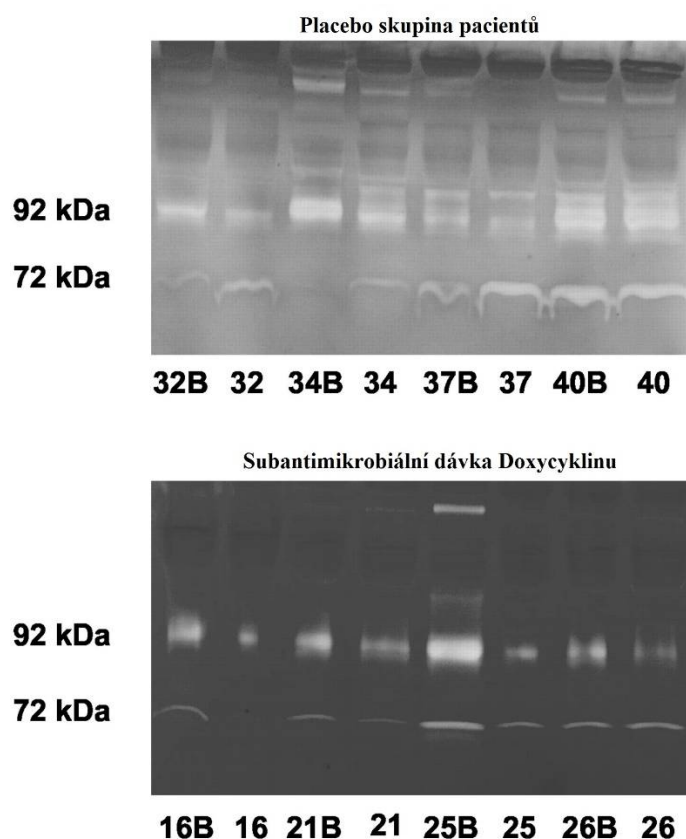
Zvýšené hladiny cirkulující MMP-10 byly zase objeveny u pacientů s PAD, a to v souladu se závažností a ve spojení se špatnými výsledky. Zároveň u těchto pacientů byly zjištěny i zvýšené hladiny MMP-2 a MMP-9. Nicméně jejich užitečnost jako nástrojů pro diagnózu a prognózu nebylo prozatím řádně stanoveno (28).

U MMP-1 byly její zvýšené hladiny spojeny se starším věkem pacienta, nižším BMI a také nižšími hodnotami hemoglobinu v krvi. MMP-1 má pozitivní vztah s TIMP-1 a adiponektinem (26). Významně jsou její hodnoty zvýšeny u pacientů s CAD (42).

Souhrnně lze říci, že aktivita MMP se zvyšuje u vysoce zánětlivých aterosklerotických plátů. U nestabilních plátů byly nalezeny zvýšené hladiny MMP-1, MMP-3, MMP-8 a MMP-9 v porovnání s fibrózními pláty. MMP-2, MMP-9 a MMP-14 degradují bazální membránu kolem SMC, čímž se tyto buňky dostanou do kontaktu s ECM. Tímto mechanismem se klidné buňky hladkého svalstva v cévách (VSMC) přemění do proliferační a migrační formy (42).

5.2 Inhibice metaloproteinázy pomocí antibiotika doxycyklinu

Nestabilní aterosklerotický plát, u kterého je velký předpoklad ruptury, vykazuje intenzivní zánět, pronikání makrofágů, lymfocytů i žírných buněk. Makrofágy produkují MMP, které postupně degradují komponenty kolagenu fibrózní čepičky. Její poškození podněcuje trombózu, která je spojena s velkým množstvím klinických událostí. Z tohoto důvodu je inhibice aktivity MMP nebo potlačení zánětu, který v cévě probíhá, lákavým cílem, jak předejít ruptuře plátu. A právě touto myšlenkou se zabývala studie z roku 2016 (David L. Brown a kol.). Antibiotikum doxycyklin v sub-antimikrobiálních dávkách přímo inhibuje MMP a také má obecné protizánětlivé vlastnosti, jakými je například schopnost inhibovat několik cytokinů. Studovali působení doxycyklinu na MMP-2 a MMP-9 a dále také IL-1 β a IL-6. Denzitometrická analýza zymogramu latentní formy pro-MMP-9, jak je uvedeno na obrázku 9, odhalila statisticky velmi významný efekt působení doxycyklinu a to takový, že léčba doxycyklinem snížila aktivitu MMP-9 až o 43 % a to s vysokou účinností u pacientů s akutní CAD. Toto zjištění, které bylo v této studii ověřeno, může mít velké dopady v prevenci akutních koronárních příhod, nicméně je zapotřebí více výzkumů, aby se toto potvrdilo (22).



Obrázek 9 – Inhibice metaloproteinázy pomocí antibiotika doxycyklinu – zymogram¹²

Popis obrázku: Příklad želatinového zymogramu u placebo skupiny pacientů a skupiny pacientů, kteří byli podrobeni léčbě doxycyklinem. Pás označený 92 kDa představuje pro-MMP-9. Pás označený 72 kDa představuje pro-MMP-2. Každý vzorek pacienta je očíslovaný a představuje přilehlé pruhy. První pruh (B) je před léčbou a druhý pruh je po 6 měsíční léčbě (22).

¹² BROWN, D. L. a kol. cit. s. 736.

6 INTERLEUKIN-1 A INTERLEUKIN-6 A JEJICH ROLE V ATEROSKLERÓZE

6.1 Pojem cytokin a interleukin

Termín cytokin pochází z řeckých slov *cytos-*, což znamená buňka a slova *-kine*, což v překladu znamená pohybovat se. Původním záměrem, proč vznikl tento pojem, bylo odlišit tuto skupinu molekul, které zvyšují obranyschopnost organismu (jsou imunomodulační), od růstových faktorů. Jelikož se však jejich funkce značně překrývaly, bylo toto rozdělení nadbytečné. Do skupiny cytokinů tedy zahrnujeme interleukiny, tumor necrosis faktor a podskupinu interferonů (43).

Interleukiny jsou jednoduše řečeno skupinou cytokinů, jež jsou zodpovědné za signalizaci mezi leukocyty. Nicméně tato definice není zase tak správná, jelikož interleukiny jsou produkovány i ne-hematopoetickými typy buněk, jakými jsou například cévní endotelové buňky a SMC. Dnes je známo nejméně 26 členů interleukinů, značené jako IL-1 až IL-26. Tato skupina cytokinů realizuje celou škálu funkcí, jakými jsou aktivace buněk, chemotaxe, diferenciací a proliferace, a to u rozsáhlého spektra buněčných typů (43). Mononukleární buňky uvolňují cytokiny, a to především IL-1 a IL-6 (14). Tyto zmíněné cytokiny regulují transkripci MMP buď pozitivně nebo negativně (18).

Různé cytokiny působí odlišně na aterogenezi, působí buď pro aterogenezi nebo proti aterogenezi, čímž mohou regulovat charakteristiku plátu. Cytokiny navozují expresi MMP v endotelových buňkách. Mezibuněčné nahromadění lipidů, což je typické u pěnových buněk, zvyšuje poté expresi MMP v makrofázích. Tukové buňky produkují reaktivní formy kyslíku, které přemění neaktivní formy MMP (zymogeny) na aktivní, čímž mají tyto buňky kompletní arzenál pro degradaci ECM (15).

6.2 Interleukin-1 a jeho role v ateroskleróze

6.2.1 Obecné informace o interleukinu-1

Interleukin-1 je hlavním regulátorem velkého množství zánětlivých procesů u vyšších eukaryotních buněk. Hraje klíčovou roli v řadě autoimunitních onemocnění, jako je například diabetes mellitus, revmatoidní artritida atd. V poslední době se ale ukázalo, že se podílí také na několika kardiovaskulárních onemocněních (44).

IL-1 byl poprvé popsán v roce 1972 jako faktor, který aktivuje lymfocyty. Později se ukázalo, že má mnohem více účinků. Jako například zvýšení tělesné teploty, indukci zánětu, stimulaci šíření T a B-lymfocytů a mnoho dalšího. Proto není moc překvapující, že se i jistým způsobem podílí na řadě kardiovaskulárních onemocnění, právě kvůli jeho prozánětlivým schopnostem (44). Má také důležité slovo při odklizení infekčních agens z organismu (např.: *Staphylococcus aureus* a *Mycobacterium tuberculosis*) (45). IL-1 řadíme mezi tzv. prozánětlivé cytokiny s pleiotropními biologickými účinky (pleiotropní účinek = působí na několik různých buněk) (46). IL-1 produkují především makrofágy, ale také lymfocyty, neutrofilové, keratinocyty, endotelové buňky a buňky svalové. Termín IL-1 patří dvěma příbuzným proteinům, které se ale vzájemně liší. Je to interleukin-1 α a interleukin-1 β . Tyto proteiny jsou kódovány dvěma odlišnými geny (44), ale oba se vážou na stejný receptor (45). Do rodiny IL-1 zahrnujeme i zcela odlišné proteiny, které mají antagonistickou prozánětlivou aktivitu. Jako je IL-18 a IL-33 (47).

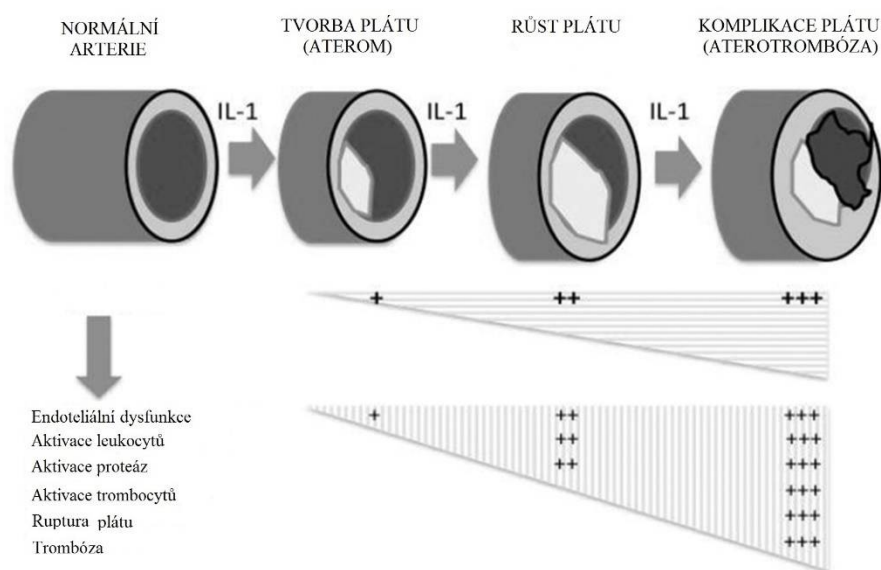
IL-1 α je syntetizován jako plně aktivní peptid, který je převážně membránově vázaný, ale může být také uvolněn z cytoplazmy následkem buněčné smrti. Podílí se více na lokální reakci při poškození a méně pak při systémové zánětlivé odpovědi (47).

IL-1 β je hlavní formou cirkulujícího IL-1. Nejprve je syntetizován jako prekurzor (proIL-1 β), který je později štěpen kaspázou-1, čímž se kaspáza-1 podílí také na tvorbě aktivního IL-1 β . Aktivní IL-1 β se pak může vázat na membránový receptor IL-1 na stejné buňce (autokrinní), na sousedících buňkách (parakrinní) nebo vstoupit do vzdálených cirkulujících buněk (endokrinní) (47). Ve spojení s aterosklerózou je nejvíce zmiňován právě IL-1 β . V rámci populace T-lymfocytů tvorba pro a proti aterogenních cytokinů závisí pravděpodobně na polarizaci subpopulace lymfocytů na fenotyp T_H1 nebo T_H2. T_H1 a T_H2 je subpopulace tzv. pomocných (helper) lymfocytů. Polarizace T_H1 upřednostňuje tvorbu takových cytokinů, které v závěru aktivují makrofágy, jež mají za následek sekreci IL-1 β (43).

6.2.2 Interleukin-1 a ateroskleróza

Ateroskleróza je popisována jako chronické zánětlivé onemocnění. A jelikož IL-1 je důležitým mediátorem zánětu, lze předpokládat, že se tohoto patologického děje bude nějakým způsobem účastnit. Tvorba IL-1 α a IL-1 β byla nalezena v rámci lidských aterosklerotických plátů, což znamená, že mají vztah k jejich vývoji. IL-1 β je produkován především makrofágy a endotelovými buňkami a jeho zvýšené hladiny byly nalezeny v perikardiální

tekutině (= usnadňuje pohyby srdce) u pacientů s CAD, oproti jiným cytokinům (např.: IL-6 nebo TNF α) (45, 47). Tukové buňky také představují zdroj IL-1 β (43). Bylo také zjištěno, že cirkulující hladiny IL-1 β jsou vyšší u pacientů s NAP oproti pacientům se SAP (45). Zvýšená hladina IL-1 β v plazmě byla nalezena i u pacientů, kteří trpí hypercholesterolémií (14). IL-1 je tvořen v cévách, kde je koronární ateroskleróza. U různých experimentálních modelů byla inhibice IL-1 spojena se sníženou tvorbou neointimy (48). To, jak se IL-1 podílí na ateroskleróze, uvádí obrázek 10.



Obrázek 10 - Role IL-1 v ateroskleróze¹³

IL-1 indukuje tvorbu IL-6. Oba tyto cytokiny pak stimulují tvorbu CRP v hepatocytech. Zvýšení CRP je spojeno se vznikem budoucích kardiovaskulárních příhod. Jeho hodnota se zvyšuje po AKS. Tudíž IL-1 může působit jako hnací síla AKS ve spojení se zánětlivou odpovědí (48).

Jedním z možných způsobů, jak se IL-1 účastní aterogeneze, je jeho schopnost podnítit nestabilitu ateromatózního plátu, která je způsobená nadměrnou tvorbou MMP na straně, kde se plát tvoří. Ukázalo se, že zvýšené hodnoty IL-1 podporují nadměrnou syntézu MMP v endotelových buňkách a SMC. Další způsob, jak se IL-1 podílí na ateroskleróze, je přisuzován jeho schopnosti regulovat adhezi a následnou infiltraci monocytů do sub-endotelového prostoru (44). Bylo pozorováno, že prozánětlivý IL-1 β a další molekuly (např.: CD40L) stimulují expresi MMP u monocytů i u makrofágů. Konkrétně jsou nadměrně produkovány MMP-1, MMP-3,

¹³ VAN TASSELL, B. W. a kol. cit. s. 1912.

MMP10 a MMP-12 a to pravděpodobně sekundárním zvýšením jejich produkce pomocí IL-1 α a IL-1 β . IL-1 β může být tvořen v plátu v reakci na oxidovaný LDL-C (5).

Ukázalo se, že IL-1 stimulací monocytů zvyšuje i produkci MMP-9 (13, 46). Avšak pouze jedna studie prokázala kvantitativní analýzou roli IL-1 v ateroskleróze. Tato studie zjistila, že inhibice IL-1, která je zprostředkována protilátkami, nemění významně velikost již celkem pokročilých plátů v brachiocefalické tepně. Dnes není jasné, zda nedostatečný vliv na velikost plátu může být způsoben rozdílným umístěním lézí nebo způsobem inhibice IL-1. Celkově však výsledky naznačují, že IL-1 má roli v aterogenezi při zvětšování velikosti aterosklerotického plátu v aortálním kmenu, zejména pak u pokročilých plátů (45). IL-1 β indukuje tvorbu MMP-12 (5).

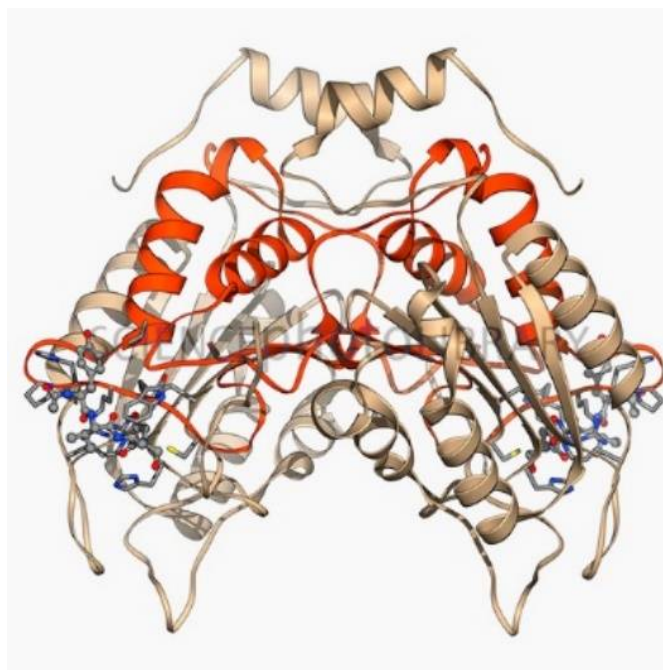
IL-1 má roli v procesu hojení po akutním MI. Je zapojený do jakéhosi „náboru“ leukocytů a koordinuje zánětlivou odpověď na infarkt. Při buněčné smrti uvolňují z cytoplazmy kardiomyocyty, fibroblasty a srdeční rezistentní endotelové buňky do tkáně IL-1 α a proIL-1 β . Tato tkáň je citlivá ke štěpení nebo aktivaci IL-1 β pomocí extracelulárních enzymů, jako je neutrofilní elastáza. Jakmile jsou leukocyty aktivovány, jsou pravděpodobně hlavní zdrojem IL-1 β . Tento průběh v srdci sleduje a reguluje proces hojení (47).

Zánětlivý efekt, který je zprostředkovaný IL-1, může být zrušen účinným přirozeným inhibítozem, jakým je antagonist receptoru IL-1 (IL-1Ra). A právě jedna studie prokázala, že poměr IL-1/IL-1Ra hraje rozhodující roli v patogenezi zánětu cévy a aterosklerózy. Zajímavé také je, že hladina IL-1Ra je až 7krát zvýšena u obézních pacientů (44). Významně zvýšené hladiny IL-1 β a také IL-1Ra byly také nalezeny u pacientů s MI (43, 44). U Apo-E deficitních myší IL-1Ra inhibuje vytváření tukových proužků v intimě cévy a při genetické delecii receptoru IL-1 došlo ke snížení aterosklerózy v reakci na podávání tuku (48). Zajímavé je, že IL-1 může být také zapojen do mechanismu pro obnovu srdeční činnosti po mrtvici (44).

Zajímavá studie, je z roku 2016 (H.-J. Kang a kol.), která se zabývala vtahem mezi IL-1 β a depresivní poruchou po AKS. Studie objevila vyšší hladiny IL-1 β u depresivních nebo vyčerpaných pacientů s AKS. Podala rovněž zprávu o tom, že IL-1 β je zapojený v zánětlivé kaskádě na počátku deprese u pacientů s AKS. Hlavním zjištěním této studie je, že deprese během akutní fáze AKS je ve významné asociaci s hladinami IL-1 β . Konkrétně, že během

akutní fáze AKS je deprese ve vzájemném vztahu s alelou 511 T, která stimuluje větší sekreci IL-1 β (49).

Jistou výzvou a zároveň i problémem je přímé stanovení IL-1 β , jelikož je ve spoustě případů nedetekovatelný, i když je u dané nemoci jasný důkaz zvýšené aktivity IL-1 β . Jen velmi malé množství studií měřilo a prokázalo zvýšenou aktivitu IL-1 β u pacientů, kteří měli větší zátěž aterosklerózy, nebo u pacientů, kteří měli málo příznivou prognózu po AKS (47). Molekula IL-1 β je uvedena na obrázku 11.



Obrázek 11 - Molekula IL-1 β ¹⁴

Existují tedy značné důkazy o dopadech IL-1 α , IL-1 β a IL-1Ra v různých patologiích kardiovaskulárního systému. Nicméně je zapotřebí mnohem více studií, které by téma IL-1 studovaly a ověřovaly na lidech. Jejich úkolem bude objasnit komplexní působení IL-1 na kardiovaskulární systém, a to v celém rozsahu (44).

6.2.3 Interleukin-33

IL-33 je tvořen v koronárních arteriích v SMC, dále pak v endotheliu a srdečními fibroblasty, což má za následek, že hraje důležitou roli v různých kardiovaskulárních poruchách. Uvažuje se, že IL-33 hraje však spíše ochrannou roli v rozvoji aterosklerózy. Studie z roku 2013 (Guzel S. a kol.) zjistila, že IL-33 významně zvyšuje hladiny IL-4, IL-5

¹⁴ Interleukin-1 β molecule, Science Photo Library cit. [online].

a IL-13, ale naopak snižuje hladiny interferonu γ (IFN- γ). Hladiny IL-33 jsou zvýšené ve skupině pacientů s NSTEMI v porovnání s kontrolní skupinou. Nevyšší hladiny IL-33 byly zjištěny ve vzorcích po 12 hodinách od přijetí po NSTEMI, které poté postupně klesaly, a naopak nejnižší hladiny IL-33 byly zjištěny po přijetí pacientů s NSTEMI. Ukázalo se, že IL-33 má obrannou roli. Jeho ochranná role spočívá v tom, že brání aktivaci MMP a zániku ECM (inhibuje uvolňování IFN- γ). IL-33 by tedy mohl hrát preventivní roli zejména v časně fázi NSTEMI. Studie Guzel S. a kol. také zjistila, že hladiny IL-33 byly negativně korelovány s hladinami MMP-9, TIMP-1 a CRP (25, 43).

6.3 Interleukin-6 a jeho role v ateroskleróze

6.3.1 Obecné informace o interleukinu-6

Interleukin-6 je glykoprotein s jediným řetězcem. Vytváří ho velké množství typů buněk, kterými jsou například aktivované monocyty a endotelové buňky, a to pod vlivem jiných prozánětlivých cytokinů (např.: IL-1). Účastní se proliferace SMC. IL-6 řadíme mezi prozánětlivé cytokiny a také reprezentuje prokoagulační cytokiny (8, 31, 50). Jednou z jeho asi nejdůležitějších funkcí je zesílení tzv. zánětlivé kaskády. Díky tomu může IL-6, alespoň částečně, projevit své proatherogenní účinky v arteriální stěně (31). Podněcuje diferenciaci monocytů na makrofágy, čímž velmi přispívá k tvorbě zánětu v cévě a podílí se také na tvorbě aneurysmatu (51). Spolu s IL-1 aktivuje T-buňky, dále také podněcuje diferenciaci B-lymfocytů a stimulaci krvetvorby. V endotelových buňkách stimuluje expresi rozpustné intracelulární molekuly 1 (sICAM-1), která umožňuje pohyb a adhezi leukocytů skrze endotel (50). V játrech IL-6 indukuje syntézu CRP a také ostatních reaktantů akutní fáze (7). Po dlouhodobém posuzování byl nalezen a zhodnocen vztah mezi CRP u pacientů a výskytem stabilní CAD a AKS (14).

6.3.2 Interleukin-6 a ateroskleróza

Velké množství studií zkoumalo hladiny IL-6 v plazmě jako potencionálního nástroje pro předpověď budoucích kardiovaskulárních onemocnění. IL-6 byl ve velkém množství nalezen v lidském aterosklerotickém plátu, a to zejména v krajní oblasti stabilního i nestabilního plátu (31). Uvnitř ateromu je uvolňován především z makrofágů a endotelových buněk. Zdrojem IL-6 jsou také tukové buňky (43). Jeho role v šíření a destabilizaci plátu byla prokázána v několika experimentálních pracích. Zvýšené hladiny IL-6 byly nalezeny u subjektů bez zjevných příznaků jakékoli nemoci, ale ve spojení se zvyšujícím se rizikem AKS (8).

V klinických studiích byly pak jeho hladiny významně zvýšené u pacientů, kteří měli větší riziko vzniku MI než zdraví jedinci, a také u těch, kde hrozila pozdní kardiovaskulární příhoda po prodělané operaci srdce. Zvyšující se hladiny IL-6 byly, během ročního sledování, také spojeny nezávisle se zvyšující se mortalitou. Toto by v důsledku znamenalo, že by zvýšená hladina IL-6 mohla identifikovat nemocného s vysokým rizikem vzniku AKS (7).

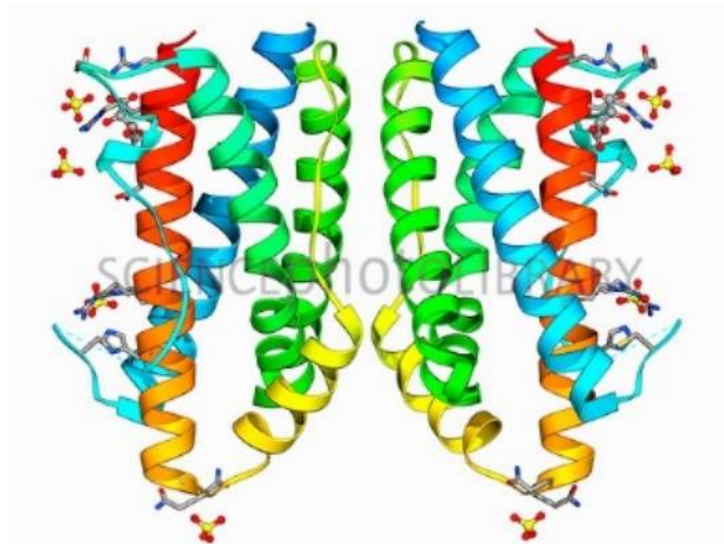
IL-6 může být také hlavním regulátorem složení a reorganizace ECM, což je důležitým aspektem pro vývoj a stabilitu aterosklerotického plátu. Bylo zjištěno, že IL-6 má dvojitou regulační roli v ateroskleróze. První je redukce naakumulovaných lipidů a druhou je zvýšení přijímání zánětlivých buněk směrem k aterosklerotickému plátu, čímž se usměrňuje hromadění ECM v cévě. IL-6 byl dlouho spojován jen s NAP jako potenciální ukazatel destabilizace plátu. Analýza in vivo odhalila, že IL-6 podněcuje diferenciaci monocytů, expresi MMP a aktivaci komplementu, což je součástí nespecifické humorální imunitní odpovědi, skrze proteiny akutní fáze, čímž mohou změnit složení fibrózní čepičky (3). Bylo nalezeno silné spojení mezi IL-6 a MI/smrtí (38). Významně zvýšené hladiny byly nalezeny u pacientů s CAD (14).

Vyšší koncentrace IL-6 byla nalezena u starších pacientů, jejichž společným znakem bylo, že trpěli velkou arteriální aterosklerózou (27). Studie z roku 2004 provedená na myších zjistila, že IL-6 se podílí na zvýšení ostatních prozánětlivých regulátorů, jako je například TNF α a IL-1. Nejen z tohoto důvodu by IL-6 mohl být důležitým ukazatelem recidivy kardiovaskulárních příhod. Zajímavé je, že nedostatek IL-6 může způsobit posunutí rovnováhy mezi TIMP-1 a MMP-9 směrem k ještě více nevyvážené aktivaci MMP (3).

Pacienti s AKS mají zvýšené hladiny IL-6. Výsledky studie z roku 2011 prokázaly, že IL-6 je vylučován z poškozeného vulnerabilního plátu a že aktivuje místní makrofágy. Je tedy důležitým ukazatelem procesu uzavírání tepny u AKS. IL-6 také odráží intenzitu poškození funkce endotelových buněk. Je nezávislým ukazatelem úmrtí u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (50). Bylo také odhaleno, že výsledek hlavní celkové stenózy a základní hladiny IL-6 jsou v důležitém a vzájemném vztahu u pacientů s velkou arteriální aterosklerózou po mrtvici (52).

Koncentrace IL-6 v séru má důležitý a pozitivní vztah s Troponinem I a CK, což by mohlo znamenat, že IL-6 by mohl být ukazatelem srdečního úmrtí u pacientů se STEMI, kteří byli pozorováni během 24 měsíců. Výsledky měření naznačují, že stanovení hladiny IL-6 v séru by mohlo poskytnout drahocennou informaci o dlouhodobém rozvrstvení (stratifikaci)

rizik po prodělání MI. Cirkulující hladiny IL-6 úzce souvisí se změnami v levé komoře během remodelačního procesu u pacientů s MI, u nichž došlo k obnovení krevního zásobení (reperfuzi). U pacientů s NAP je IL-6 účinným ukazatelem rizika vážných srdečních příhod. Jelikož IL-6 je hlavním spouštěčem syntézy CRP, mohl by tak být demografickým ukazatelem a mít předpovědní hodnotu u budoucích kardiovaskulárních příhod (36). Na obrázku 12 je vyobrazena molekula IL-6.



Obrázek 12 - Molekula IL-6¹⁵

Studie z roku 2016 (Lin Hao a kol.) také prokázala zvýšené hladiny IL-6 u pacientů s AKS. Zvýšená hladina tohoto prozánětlivého faktoru může poukazovat na zvýšenou zánětlivost u pacientů s AKS. Jakmile dojde k porušení aterosklerotického plátu, spustí se zánětlivá kaskáda. Zesílení zánětu je spojováno s nestabilitou plátu. Tato studie také zjistila, že hladiny IL-6 jsou významně zvýšené u pacientů s MI, a to v akutní fázi MI oproti kontrolní skupině. Zvýšené hladiny IL-6 v séru byly také spojené s vývojem CAD. Byla také první studií, které analyzovala diagnostické hodnoty IL-6 a IFN- γ u pacientů s AKS a diabetem druhého typu pomocí metody ELISA. Zvýšené hodnoty těchto dvou cytokinů jsou ve spojení s větší závažností koronárního onemocnění u pacientů s AKS a diabetem druhého typu. Výsledky ukázaly, že zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů u pacientů s AKS mohou způsobit nestabilitu aterosklerotických plátů a zvýšená hladina glukózy může tento proces urychlit. Jedním z omezení této studie, byla i relativně malá velikost souboru pacientů, a navíc

¹⁵ Interleukin-6, molecular model, Science Photo Library cit. [online]

tato uvedená studie byla provedena v jediném středisku, takže ji nemůže být přisuzována statistická významnost (53).

Jiná studie z roku 2017 (Razi a kol.) změřila hodnoty IL-6 a u kontrolní skupiny, NAP, STEMI, NSTEMI. Průměrné hodnoty IL-6 se pohybovaly okolo $5,0560 \pm 2,01$ pg/ml u kontrolní skupiny, $54,36 \pm 13,46$ pg/ml u NAP, $101,22 \pm 6,67$ pg/ml u NSTEMI a $125,60 \pm 28,05$ pg/ml u STEMI. Z výše uvedeného vyplývá, že nejvyšší hodnoty IL-6 v podskupině pacientů s AKS byly naměřeny u pacientů se STEMI. Pacienti s NAP měli koncentraci IL-6 vyšší než pacienti se SAP. Stanoveno metodou ELISA. Zvýšené hladiny IL-6 po přijetí pacienta byly ukazatelem nepříznivé kardiovaskulární příhody v nemocnici. IL-6 je nespecifický zánětlivý marker a nemusí tedy vždy nutně znamenat spojení mezi CAD. Nicméně studie opět potvrdila, že významně zvýšené hodnoty tohoto zánětlivého markeru byly nalezeny u pacientů s AKS (54).

Avšak použití IL-6 jako biomarkeru je omezeno tím, že jeho hodnoty během dne kolísají a také z nedostatku potvrzených studií (14). Nicméně by se mohl stát v budoucnu užitečným markerem k identifikaci podskupiny pacientů s AKS, který by tak umožnil stanovení diagnózy a včasné zahájení léčby (53).

6.4 Interleukin-6 a solubilní liganda CD40

Liganda CD40 (CD40L) patří mezi transmembránové glykoproteiny. Je tvořena především aktivovanými T-lymfocyty a aktivovanými trombocyty, ale může být produkována i endotelovými buňkami a SMC (55). V několika různých studiích se ukázalo, že CD40L má vztah k vysokému obsahu lipidů uvnitř plátu, což znamená, že je také důležitým aspektem v ateroskleróze, a navíc může vyvolat prozánětlivou kaskádu uvnitř cévní stěny (31).

CD40L, jak už bylo řečeno, může být tvořena trombocyty. K její tvorbě na jejich povrchu dochází během několika vteřin po aktivaci trombocytů, následně se štěpí za vzniku rozpustného trimerního fragmentu (56). Tato liganda může pomocí receptoru CD40 umožnit vazbu trombocytů na endotelie a monocyty. Vzájemná reakce ligandy CD40 a jejího receptoru může podnítit vznik zánětu v cévním řečišti (4). A právě zvýšené hladiny rozpustné (solubilní) varianty CD40L (sCD40L), byly nalezeny v plazmě u pacientů s AKS a znamenaly i zvýšené riziko vzniku MI (31). Solubilní liganda CD40 je prozánětlivý marker, u kterého se ukázalo, že podněcuje aterosklerózu a nestabilitu plátu. U zdravých žen, které měly vysoké hladiny sCD40L, bylo zjištěno zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních příhod (14). Jedna studie

z roku 2014 (Halim a kol.) prokázala velké spojení mezi sCD40L, náhlou smrtí a akutním MI (38, 56). sCD40L by tedy mohl být důležitým markerem u pacientů s AKS, nicméně je nutné další vyšetřování a zodpovězení některých analytických otázek, jako například standardizovat načasování odebírání krevních vzorků u studií, které se zabývají stanovením koncentrace sCD40L u pacientů s AKS (31).

Zajímavým zjištěním bylo, že pacienti s akutním MI měli zvýšené hladiny sCD40L a zároveň také IL-6. Nicméně u pokročilých stavů nemocí byly hladiny sCD40L nezávisle spojeny pouze s kouřením a diabetem (56). IL-6 společně s ligandou CD40 mohou aktivovat makrofágy v aterosklerotickém plátu, které následně produkují MMP (36). Zejména u pacientů s AKS, kteří podstoupí perkutánní koronární intervenci neboli dříve angioplastika koronárních cév (57), jsou hladiny CD40L a IL-1 uvnitř koronárních tepen vyšší v krvi, která je odebrána z tepny, která je viníkem v porovnání s krví odebranou z periferní tepny (56). IL-1 může zvýšit expresi CD40 a CD40L (43).

7 STUDIE MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY A INTERLEUKINY-1 A -6

Cytokiny (IL-1, konkrétně především IL-1 β , IL-6), sCD40L a MMP (hlavně MMP-9) jsou všechny určitým způsobem zapojené ve vývoji nestabilního plátu a jsou považovány za doplňující prognostické informace v prevenci budoucích kardiovaskulárních příhod (14). Prozánětlivé cytokiny, jako IL-1 β a také například CD40L, stimulují v buňkách cévní stěny expresi několika MMP (43). U zvířecích studií bylo objeveno, že IL-1 β zvyšuje regulaci hladin MMP-2 a MMP-9. Rovněž zjistili, že hodnota MMP-1 se zvyšuje po následné stimulaci IL-1 β (16). Dále také IL-1 β stimuluje expresi MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-11 a MMP-13 (43).

Cílem studie z roku 2005 (A. Manginas a kol.) bylo vyšetřit u pacientů s AKS a SAP hodnoty MMP-9 a TIMP-1 ve vztahu k široce známým markerům zánětu, jakými byly IL-6 a CRP. Vzorky periferní krve byly odebrány do 48 hodin od prvotních příznaků. Hodnoty MMP-9, IL-6 a TIMP-1 byly stanoveny metodou ELISA a CRP pomocí imunonefelometrické metody. Významného vztahu bylo dosaženo mezi MMP-9, CRP a IL-6. Pozoruhodný vztah byl objeven mezi IL-6 a TIMP-1 a také mezi IL-6 a MMP-9. Bylo potvrzeno, že MMP-9 a TIMP-1 přispívají k AKS, ať už s nebo bez zjevného důkazu nekrózy myokardu. Tento vztah je podmíněn jejich spojením s IL-6 a CRP (34).

Ve studii z roku 2008 (J. Tan a kol.) byly nalezeny u pacientů se STEMI významně vysoké hladiny IL-6, sCD40L, MMP-9, TIMP-1 a poměr MMP-9/TIMP-1 v porovnání s kontrolní skupinou (36).

Studie Tahindi a kol., 2011 vypočetla Cut-Off hodnoty u pacientů s CAD pro MMP-1, MMP-9 a IL-6, které jsou uvedené v tabulce 4, i když senzitivita nebyla moc dobrá. Zároveň zjistila, že hladiny MMP-1, MMP-9 a IL-6 v séru u vzorků, které byly odebrány do 72 hodin od přijetí u STEMI a NSTEMI pacientů, nekorelují se známými markery jako je CK, CK-MB a troponin T. Naopak objevila významný a pozitivní vztah mezi MMP-9, MMP-1 a IL-6 a závažnou stenózou u levé přední sestupné arterie. Pacienti s tímto onemocněním měli také vyšší hladiny uvedených markerů (tedy MMP-9, MMP-1 a IL-6). Nakonec lze tedy shrnout, že hladiny IL-6, MMP-9 a MMP-1 v krvi jsou zvýšené u pacientů s CAD a toto zvýšení je výraznější u pacientů s AKS (42).

Tabulka 4 - Hladiny Cut-Off MMP-1, MMP-9 a IL-6 pro CAD¹⁶

	Cut-Off hladina	Senzitivita (%)	Specifita (%)
MMP-1 (ng/ml)	>2,03	57	93
MMP-9 (ng/ml)	>158	72	63
IL-6 (pg/ml)	>1,97	46	86

Bylo zjištěno, že na nástup AKS mají vliv i psychosociální faktory. Tento vliv je zprostředkován skrz jejich účinkování na zánět, trombózu a na faktory, které vedou k destabilizaci plátu. Jedna studie objevila, že psychosociální faktory jsou ve vzájemném vztahu se zvyšujícími se hladinami monocytů u pacientů s AKS brzy po přijetí. Prozánětlivé cytokiny, jako například IL-1, vyvolají chemoatrakci leukocytů přes endotelium a makrofágy. Makrofágy následně aktivují MMP, které jak už bylo výše zmíněno, podněcují nestabilitu plátu a způsobují ve většině případů AKS. Studie z roku 2016 (N. Fernandez Machulsky a kol.) se zabývala touto problematikou a vztahem mezi MMP-2, MMP-9 a prozánětlivými cytokiny (IL-1 β) u pacientů s AKS. Pacientům s AKS byla po přijetí odebrána krev a následně centrifugována. Vzorek séra byl použit pro měření IL-1 β a koncentraci MMP-9. Vzorky plazmy byly naopak použity pro stanovení aktivity MMP-2 a MMP-9. IL-1 β byl stanoven chemiluminiscenční metodou. Koncentrace MMP-9 byla změřena pomocí metody ELISA. Aktivita MMP-2 a MMP-9 byla stanovena pomocí želatinové zymografie a zhodnocení psychického stavu se posuzovalo pomocí ověřených dotazníků. U pacientů, kteří se projevovali agresivním či nepřátelským chováním vůči druhým lidem (hostilita), byl nalezen silný vzájemný vztah s MMP-2. Pozoruhodným zjištěním bylo, že toto chování vysvětlilo 16 % odchylku aktivity MMP-2 po akutním MI. Zajímavé zjištění bylo, že u všech pacientů má IL-1 β významnou souvislost s koncentrací MMP-9 (58).

¹⁶TANINDI, A. a kol. cit. s. 114.

ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo uspořádat informace o vlivu matrixových metaloproteináz a interleukinu-1 a -6 na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Podrobně jsem se zaměřila na vztah matrixových metaloproteináz a interleukinu-1 a -6 ke vzniku akutního koronárního syndromu, a také na současné poznatky ohledně metod stanovení těchto látek v lidském biologickém séru. Ve své práci jsem zjistila, že matrixové metaloproteinázy a interleukiny-1 a -6 mají opravdu vliv na vznik a rozvoj kardiovaskulárních onemocnění a také, že se podílí na vzniku akutního koronárního syndromu, zejména MMP-9 a interleukin-6.

Matrixové metaloproteinázy jako enzymy, které ve své struktuře obsahují Zn^{2+} , se účastní řady fyziologických procesů. Jejich hlavní funkcí je štěpení komponent extracelulární matrix. Hlavní rolí metaloproteináz v ateroskleróze, což je nejčastější mechanismus zodpovědný za vznik akutního koronárního syndromu, je jejich schopnost degradovat extracelulární matrix. Tímto procesem dochází k redukci fibrózní čepičky a kolagenového obsahu, čímž mohou způsobit destabilizaci aterosklerotického plátu. Hlavní zdrojem matrixových metaloproteináz v aterosklerotických lézích jsou makrofágy. Několik studií ukázalo zvýšené hladiny matrixových metaloproteináz u akutního koronárního syndromu a u pokročilé ischemické choroby srdeční a byly rovněž spojeny s budoucím rizikem dalších kardiovaskulárních příhod. Zajímavé je i zjištění, že specifické tkáňové inhibitory metaloproteináz jsou také ve spojení se vzrůstajícím rizikem u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Nejbližší k uvedení do klinické praxe má dnes MMP-9. Výsledky několika studií potvrdily, že hladina MMP-9 je významně zvýšená u pacientů s akutním koronárním syndromem. Dále výsledky jedné studie poukazyvaly na to, že se hladina MMP-9 zvyšuje se zvyšující se závažností klinického projevu. Důležitým ukazatelem by mohl být i poměr MMP-9 a TIMP-1, jehož podstatně zvýšené hodnoty byly rovněž nalezeny u pacientů s akutním koronárním syndromem.

Jelikož je ateroskleróza známá jako chronické zánětlivé onemocnění, hraje zánět důležitou roli v procesu destabilizace plátu. A právě interleukiny-1 a -6 jako jedni z hlavních regulátorů zánětlivých procesů se tohoto děje také určitým způsobem účastní. Interleukin-1 byl v aterosklerotických lézích nalezen nejčastěji jako forma interleukin-1 β , produkovaný nejvíce makrofágy. Interleukin-1 podporuje nadměrnou regulaci matrixových metaloproteináz, například MMP-9 a indukuje také tvorbu interleukinu-6. Nicméně jen málo studií měřilo

a prokázalo aktivitu interleukinu-1 β u pacientů s akutním koronárním syndromem. Zdrojem interleukinu-6 v aterosklerotických lézích jsou také nejvíce makrofágy. Zvýšené hladiny tohoto interleukinu byly nalezeny u pacientů se zvýšeným rizikem akutního koronárního syndromu a také u pacientů, kteří měli větší riziko vzniku akutního infarktu myokardu. Konečným výsledkem několika studií bylo, že zvýšená hladina interleukinu-6 by mohla identifikovat pacienta s vysokým rizikem vzniku akutního koronárního syndromu.

Některé studie rovněž potvrdily, že existuje i určitý vztah mezi interleukiny-1 a -6 a matrixovými metaloproteinázami ve vztahu ke kardiovaskulárním onemocněním a akutnímu koronárnímu syndromu. Například, že interleukin-1 β zvyšuje regulaci hladin několika metaloproteináz, zejména MMP-2 a MMP-9. Vzájemný vztah byl nalezen mezi interleukinem-6 a MMP-9, čímž mohou přispívat k akutnímu koronárnímu syndromu. Matrixové metaloproteinázy se nejčastěji stanovují v séru pomocí metody ELISA a aktivita matrixových metaloproteináz nejčastěji pomocí metody substrátové zymografie. Interlukiny-1 a -6 se stanovují především imunochemickými metodami, také především metodou ELISA.

Závěrem lze tedy říci, že výše zmíněné výsledky studií potvrzují, že matrixové metaloproteinázy a interleukiny-1 a -6, zejména MMP-9 a interleukin-6, jsou nadějnými markery pro akutní koronární syndrom a jiná kardiovaskulární onemocnění, jelikož by mohli identifikovat pacienta již ve fázi časně ischemie myokardu. Perfektní diagnóza, prognóza a léčba akutního koronárního syndromu je dnes hlavní výzvou v medicíně. Nicméně je stále zapotřebí více studií před jejich uvedením do klinické praxe, jelikož je známo, že cesta markeru od jeho objevení až po jeho rutinní používání je dlouhá. Hlavním cílem budoucích studií bude určit například referenční rozmezí těchto látek, zajistit vysokou senzitivitu a specifitu stanovení, a především snížit náklady na stanovení těchto látek, jelikož zdlouhavé stanovení například metodou zymografie a nákladnost spolu s krátkou expirací souprav především imunochemických metod je velkou překážkou jejich rutinního využívání.

POUŽITÁ LITERATURA

1. DARABI, F., M. AGHAEI, A. MOVAHEDIAN et al. The role of serum levels of microRNA-21 and matrix metalloproteinase-9 in patients with acute coronary syndrome. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2016, **422**(1-2), 51-60. ISSN 03008177.
2. KNOT, J., M. PĚNIČKA, K. ČURILA a kol. Akutní koronární syndrom. *Medicína pro praxi*. 2007, **4**, 153-155. ISSN 1803-5310.
3. SCHIEFFER, B. Impact of Interleukin-6 on Plaque Development and Morphology in Experimental Atherosclerosis. *Circulation*. 2004, **110**(22), 3493-3500. ISSN 00097322.
4. VOJÁČEK, J., M. MATES a V. HRABOŠ. Nové názory na vznik akutního koronárního syndromu. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2003, **2**(2), 69-72. ISSN 1213-807X
5. NEWBY, A. Metalloproteinase production from macrophages – a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. *Experimental Physiology*. 2016, **101**(11), 1327-1337. ISSN 09580670.
6. GANDALOVIČOVÁ, J. Nový směr prevence akutních koronárních syndromů: Identifikace a stabilizace vysoce rizikového aterosklerotického plátu. *Interní medicína pro praxi*. 2002, **4**(2), 72-77. ISSN 1803-5256.
7. KETTNER, J. Nové biomarkery v akutní kardiologii. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2008, **7**(5), 193-199. ISSN 1213-807X.
8. SHAH, P. Biomarkers of Plaque Instability. *Current Cardiology Reports*. 2014, **16**(12), 547(s. 1-8). ISSN 15233782.
9. ZÍTKA, O., S. KŘÍŽKOVÁ, V. ADAM a kol. Utilizing Automated Chip Electrophoresis for Study of Lactoferrin and Matrix Metalloproteinases. *Chemické listy*. 2010, **104**(3), 197-201. ISSN 1213-7103.
10. KUKAČKA, J., R. KIZEK a R. PRŮŠA. Budoucnost zinkových metaloproteinů v laboratorní medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2008, **16**(37), 161-170. ISSN 1210-7921.
11. Hypoxia/Ischemia Signaling. MCQUEEN, C. and A. PARRISH. *Comprehensive toxicology*. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2010, s. 529-542. ISBN 9780080468846.
12. HAMED, G. a M. FATTAH. Clinical Relevance of Matrix Metalloproteinase 9 in Patients With Acute Coronary Syndrome. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2015, **21**(8), 705-711. ISSN 10760296.
13. KETELHUTH, D. a M. BÄCK. The Role of Matrix Metalloproteinases in Atherothrombosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 2011, **13**(2), 162-169. ISSN 15233804.
14. ZAKYNTHINOS, E. and N. PAPPA. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *Journal of Cardiology*. 2009, **53**(3), 317-333. ISSN 09145087.

15. BUSTI, C., E. FALCINELLI, S. MOMI et al. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Internal and Emergency Medicine*. 2010, **5**(1), 13-25. ISSN 18280447.
16. SPINALE, F. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiological Reviews*. 2007, **87**(4), 1285-1342. ISSN 00319333.
17. BÄCK, M., D. KETELHUTH and S. AGEWALL. Matrix Metalloproteinases in Atherothrombosis. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2010, **52**(5), 410-428. ISSN 00330620.
18. KUPAI, K., G. SZUCS, S. CSEH, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2010, **61**(2), 205-209. ISSN 10568719.
19. NEWBY, A. Role Of Metalloproteinases in Plaque Rupture. *International Journal of Gerontology*. 2007, **1**(3), 103-111. ISSN 18739598.
20. KUKAČKA, J., K. ZIKMUNDOVÁ, K. KOTAŠKA a kol. PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dyslipoproteinémií. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2007, **15**(362), 85-88. ISSN 1210-7921
21. NEWBY, A. Metalloproteinases and Vulnerable Atherosclerotic Plaques. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2007, **17**(8), 253-258. ISSN 10501738.
22. BROWN, D. Clinical and Biochemical Results of the Metalloproteinase Inhibition with Subantimicrobial Doses of Doxycycline to Prevent Acute Coronary Syndromes (MIDAS) Pilot Trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004, **24**(4), 733-738. ISSN 10795642.
23. SPINALE, F. and F. VILLARREAL. Targeting matrix metalloproteinases in heart disease: Lessons from endogenous inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 2014, **90**(1), 7-15. ISSN 00062952.
24. TANINDI, A., A. SAHINARSLAN, S. ELBEG et al. Association of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and interleukin-6 with epicardial and myocardial perfusion. *Coronary Artery Disease*. 2011, **22**(4), 253-258. ISSN 09546928.
25. GUZEL, S., O. SERIN, E. GUZEL et al. Interleukin-33, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in myocardial infarction. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2013, **28**(2), 165-173. ISSN 12263303.
26. CAVUSOGLU, E., J. MARMUR, S. HEGDE et al. Relation of baseline plasma MMP-1 levels to long-term all-cause mortality in patients with known or suspected coronary artery disease referred for coronary angiography. *Atherosclerosis*. 2015, **239**(1), 268-275. ISSN 00219150.
27. JEON, S., S. CHUN, S. CHOI-KWON et al. Biomarkers and location of atherosclerosis: Matrix metalloproteinase-2 may be related to intracranial atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012, **223**(2), 442-447. ISSN 00219150.

28. MARTINEZ-AGUILAR, E., V. GOMEZ-RODRIGUEZ, J. ORBE et al. Matrix metalloproteinase 10 is associated with disease severity and mortality in patients with peripheral arterial disease. *Journal of Vascular Surgery*. 2015, **61**(2), 428-435. ISSN 07415214.
29. CHENG, M., S. HASHMI, X. MAO et al. Relationships of adiponectin and matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio with coronary plaque morphology in patients with acute coronary syndrome. *Canadian Journal of Cardiology*. 2008, **24**(5), 385-390. ISSN 0828282x.
30. DUŠEK, J., J. ŠTÁSEK, J. BIS a kol. Směřují markery myokardiální ischemie do klinické praxe?. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2012, **11**(3-4), 138-142. ISSN-1213-807X
31. DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A., P. ABREU-GONZALEZ and J.C. KASKI. Inflammatory Systemic Biomarkers in Setting Acute Coronary Syndromes: Effects of the Diurnal Variation. *Current Drug Targets*. 2009, **10**(10), 1001-1008. ISSN 1389-4501
32. POPOVIC, S., F. CANOVIC, M. ILIC et al. Matrix metalloproteinase-9 index as a possible parameter for predicting acute coronary syndrome in diabetics. *Vojnosanitetski pregled*. 2015, **72**(5), 421-426. ISSN 00428450.
33. Chirurgická revaskularizace myokardu. *FNO* [online]. Ostrava: Fakultní nemocnice Ostrava, 2009 [cit. 2017-06-27]. Dostupné z: <http://kardiochirurgie.fno.cz/chirurgicka-revaskularizace-myokardu>
34. MANGINAS, A., E. BEI, A. CHAIDAROGLU et al. Peripheral levels of matrix metalloproteinase-9, interleukin-6, and C-reactive protein are elevated in patients with acute coronary syndromes: Correlations with serum troponin I. *Clinical Cardiology*. 2005, **28**(4), 182-186. ISSN 01609289.
35. CHAN, C., H. JIANG, L. LEUNG et al. Multiple atherosclerosis-related biomarkers associated with short – and long-term mortality after stroke. *Clinical Biochemistry*. 2012, **45**(16-17), 1308-1315. ISSN 00099120.
36. TAN, J., Q. HUA, J. GAO et al. Clinical Implications of Elevated Serum Interleukin-6, Soluble CD40 Ligand, Metalloproteinase-9, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Patients with Acute ST-segment Elevation Myocardial Infarction. *Clinical Cardiology*. 2008, **31**(9), 413-418. ISSN 01609289.
37. WANG, J., X. YANG, F. CHU et al. The Effects of Xuefu Zhuyu and Shengmai on the Evolution of Syndromes and Inflammatory Markers in Patients with Unstable Angina Pectoris after Percutaneous Coronary Intervention: A Randomised Controlled Clinical Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, **2013**, s. 1-9. ISSN 1741427x.
38. HALIM, S., M. NEELY, K. PIEPER et al. Simultaneous Consideration of Multiple Candidate Protein Biomarkers for Long-Term Risk for Cardiovascular Events. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2015, **8**(1), 168-177. ISSN 1942325x.

39. ZITKA, O., S. KRIZKOVA, D. HUSKA et al. Chip gel electrophoresis as a tool for study of matrix metalloproteinase 9 interaction with metallothionein. *ELECTROPHORESIS*. 2011, **32**(8), 857-860. ISSN 01730835.
40. GEORGE, S. and J. JOHNSON. In Situ Zymography. *Methods in Molecular Biology: Matrix Metalloproteinase Protocols* [online]. 2. Bristol, UK: Humana Press [online]. 2010, s. 271-277 [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1007/978-1-60327-299-5_17. ISBN 978-1-60327-299-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-299-5_17
41. CONWAY, J., N. CARRAGHER and P. TIMPSON. Developments in preclinical cancer imaging: innovating the discovery of therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. 2014, **14**, 314–328. ISSN 1474-175X.
42. TANINDI, A., A. SAHINARSLAN, S. ELBEG et al. Relationship Between MMP-1, MMP-9, TIMP-1, IL-6 and Risk Factors, Clinical Presentation, Extent and Severity of Atherosclerotic Coronary Artery Disease. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*. 2011, **5**(1), 110-116. ISSN 18741924.
43. YOUNG, J., P. LIBBY and U. SCHÖNBECK. Cytokines in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2002, **88**(4), 554-567. ISSN 0340-6245.
44. VICENOVÁ, B., V. VOPÁLENSKÝ, L. BURÝŠEK et al. Emerging Role of Interleukin-1 in Cardiovascular Diseases. *Physiological Research*. Praha, 2009, **58**(4), 481-498. ISSN 1802-9973.
45. ALEXANDER, M. *Interleukin-1 distinctly modulates smooth muscle cell phenotype and plays dual protective roles in advanced atherosclerosis*. Kernersville, NC, 2011. Dizertační práce. University of Virginia.
46. NURKIC, J., F. LJUCA, M. NURKIC et al. Biomarkers of Plaque Instability in Acute Coronary Syndrome Patients. *Medical Archives; Sarajevo*. 2010, **64**(2), 103-106. ISSN 0350-199X.
47. VAN TASSELL, B., S. TOLDO, E. MEZZAROMA et al. Targeting Interleukin-1 in Heart Disease. *Circulation*. 2013, **128**(17), 1910-1923. ISSN 00097322.
48. MORTON, A., A. ROTHMAN, J. GREENWOOD et al. The effect of interleukin-1 receptor antagonist therapy on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes: the MRC-ILA Heart Study. *European Heart Journal*. 2015, **36**(6), 377-384. ISSN 0195668x.
49. KANG, H., K. BAE, S. KIM et al. Relationship between interleukin-1 β and depressive disorder after acute coronary syndrome. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2017, **72**, 55-59. ISSN 02785846.
50. OWCZAREK, A., M. BABIŃSKA and J. CHUDEK. Chronic inflammation in patients with acute coronary syndrome and chronic kidney disease. *Kardiologia Polska*. 2011, **69**(4), 388-393. ISSN 0022-9032.

51. JU, X. *The Role of IL-6 in Inflammatory Aortic Aneurysmal Diseases*. Texas, 2012, 111 s. Dostupné také z: <https://utmb-ir.tdl.org/utmb-ir/handle/2152.3/828>. Dizertační práce. The University of Texas Medical Branch.
52. SHIMIZU, K., K. SHIMOMURA, Y. TOKUYAMA et al. Association between Inflammatory Biomarkers and Progression of Intracranial Large Artery Stenosis after Ischemic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2013, **22**(3), 211-217. ISSN 10523057.
53. HAO, L., Y. LIU, N. LIU et al. Serum interleukin-6 and interferon-gamma are associated with the severity of coronary disease in patients with acute coronary syndrome and type-2 diabetes. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2016, **9**(11), 22338-22344. ISSN 1940-5901.
54. RAZI, M., N. ABDALI, S. ASIF et al. Association of inflammatory cytokines/biomarkers with acute coronary syndrome and its correlation with severity and hospital outcome. *Journal of Clinical Preventive Cardiology*. 2017, **6**(2), 44-49. ISSN 2456-3366.
55. HEESCHEN, C., S. DIMMELER, C. HAMM et al. Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2003, **348**(12), 1104-1111. ISSN 00284793.
56. TOUSOULIS, D., E. ANDROULAKIS, N. PAPAGEORGIOU et al. From Atherosclerosis to Acute Coronary Syndromes: The Role of Soluble CD40 Ligand. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2010, **20**(5), 153-164. ISSN 10501738.
57. Perkutánní koronární intervence. *Kardiologie na Bulovce* [online]. Praha: Kardiologie na Bulovce s.r.o., [cit. 2017-06-27]. Dostupné z: <http://www.kardiologie-sro.cz/vysetreni/pci-perkutanni-koronarni-intervence/>.
58. FERNANDEZ MACHULSKY, N., J. GAGLIARDI, B. FABRE et al. Matrix metalloproteinases and psychosocial factors in acute coronary syndrome patients. *Psychoneuroendocrinology*. 2016, **63**, 102-108. ISSN 03064530.

ZDROJE OBRÁZKŮ NEUVEDENÉ V LITERATUŘE

- Obrázek 5 Experion. In: *McMaster University Centre for Microbial Chemical Biology* [online]. Kanada: McMaster University, ©2015-2016 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: http://www.cmcbmcmaster.ca/portfolio_page/experion/
- Obrázek 11 Interleukin-1 beta molecule. In: *Science Photo Library* [online]. Londýn: *Science Photo Library*, ©2013-2017 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <http://www.sciencephoto.com/media/525643/view>
- Obrázek 12 Interleukin-6, molecular model. In: *Science Photo Library* [online]. Londýn: *Science Photo Library*, ©2013 2017 [cit. 2017 06 09]. Dostupné z: <http://www.sciencephoto.com/media/525506/view>